

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 A23L 1/30, A61K 35/80, C07H 5/10	A1	(11) 国際公開番号 WO97/47208 (43) 国際公開日 1997年12月18日(18.12.97)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01664</p> <p>(22) 国際出願日 1997年5月15日(15.05.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/171666 1996年6月12日(12.06.96) JP 特願平8/318598 1996年11月15日(15.11.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 梅田芳久(UMEDA, Yoshihisa)(JP/JP) 〒510-01 三重県三重郡楠町大字南五味塚1315番地 寶酒造株式会社 楠工場内 Mie, (JP) 木原 大(KIHARA, Hiroshi)(JP/JP) 猪飼勝重(IKAI, Katsushige)(JP/JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒520-21 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SK, US, VN, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: FOODS OR DRINKS</p> <p>(54) 発明の名称 食品又は飲料</p> <p>(57) Abstract Foods or drinks prepared by incorporating, adding and/or diluting fucoidan originating in fucoidan-containing substances; fucoidan-containing foods or drinks which are decreased in or freed from algin originating in fucoidan-containing substances; and apoptosis-inducing foods or drinks containing an effective amount of fucoidan having an apoptosis-inducing effect.</p> <p style="text-align: center;">BEST AVAILABLE COPY</p>		

(57) 要約

フコイダン含有物由来のフコイダンを含む、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料。フコイダン含有物由来のアルギン類が低減又は除去されたフコイダンを含む食品又は飲料。アポトーシス誘発性を有するフコイダンを有効量含有するアポトーシス誘発性食品又は飲料。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロベニア共和国
AU	オーストラリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロバキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドバ共和国	TD	チャド
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	モザンビーク共和国	TG	タンザニア
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TR	トルコ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	US	米国
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	KR	韓国	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CN	中国	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ共和国	LC	セントルシア	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦		
EE	エストニア			SE	スウェーデン		

明 細 書

食品又は飲料

発明の属する技術分野

本発明はフコイダンを構成成分とする、生理的効果にも優れた食品又は飲料に関する。

従来技術

フコイダンは海藻やナマコ等に含有されるフコース硫酸を含有する多糖である。従来フコイダンに着目し、積極的に食品、飲料に用いる試みは知られていなかった。

発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、フコイダン含有の素材を提供し、該素材を利用した、食味が良く且つ健康に有用な生理作用を有する食品及び飲料を提供することにある。

課題を解決するための手段

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明はフコイダン含有物由来のフコイダン含有することを特徴とする食品又は飲料に関する。

また本発明の第2の発明はフコイダン含有物由来のアルギン類が低減又は除去されたフコイダン含有することを特徴とする食品又は飲料に関する。

更に本発明の第3の発明はフコイダン含有物由来のアポトーシス誘発性を有するフコイダンを有効量含有することを特徴とするアポトーシス誘発性食品又は飲料に関する。

次に本発明の第4の発明はフコイダン含有物由来のアルギン類が低減又は除去されたアポトーシス誘発性を有するフコイダンを有効量含有することを特徴とするアポトーシス誘発性食品又は飲料に関する。

なお本明細書においては、アルギン酸並びにその塩及びエステル又はこれらの分解物を総称してアルギン類と言う。

図面の簡単な説明

図1はフコイダン-U及びフコイダン-Fの沈殿形成率を示すものである。

図2は海藻由来抽出物（0.2 mg/ml）のアポトーシス誘発作用を示すものである。

図3は海藻由来抽出物（0.5 mg/ml）のアポトーシス誘発作用を示すものである。

図4は海藻由来抽出物（1 mg/ml）のアポトーシス誘発作用を示すものである。

図5はフコイダン-U、フコイダン-Fのアポトーシス誘発作用を示すものである。

発明の実施の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

フコイダンは海藻、ナマコ等より調製でき、本発明においてはこれらのフコイダンを使用することができる。本発明においては特にフコイダン高含有の海藻、ナマコのフコイダンの使用が好ましい。

本発明のフコイダンとしては、純化されたもの及び／又はフコイダン含有物がある。

フコイダン含有物としては、例えばフコイダン含有抽出物がある。

フコイダン含有抽出物としては、フコイダン含有物由来の原材料からの抽出物、該抽出物の処理物が包含され、フコイダン高含有抽出物が好ましい。

該フコイダン含有抽出物、例えば海藻抽出物としては、海藻の抽出をカルシウム塩存在下で行うことにより得られる抽出物が例示され、カルシウム塩としては

例えば塩化カルシウムを用いることができる。

また該海藻抽出物としては、海藻の抽出をアルカリ性溶液で行い、抽出液に、カルシウム塩を添加し得られる可溶性物が例示され、アルカリ性溶液としては例えば炭酸ナトリウム溶液を用いることができ、カルシウム塩としては例えば塩化カルシウムを用いることができる。

更に該海藻抽出物としては、海藻の抽出をアルカリ性溶液で行い、抽出液を酸性とした後、得られる可溶性物が例示され、アルカリ性溶液としては例えば炭酸ナトリウム溶液を用いることができる。

フコイダン含有物由来の原材料からの抽出温度、時間としては40～200℃、1～360分の範囲から目的に応じ選択すれば良いが、通常50～130℃、10～180分の範囲より選択して行うのが良い。

本発明に用いるフコイダンの一例としては、フコイダン含有物由来の原材料の水抽出物に比べ、フコイダン含有率が高められた物があり、更に実質的にアルギン類含量が低減、又は除去された物が挙げられる。この場合、従来食品や飲料に影響を与えていた、アルギン類由来の高粘性、酸凝固性、多価金属イオンによるゲル化等の性質を有さず、飲食品に固有の物性に影響を与えない素材が提供できる。

また特に海藻抽出物の活性炭処理物は更に海藻臭のみが選択的に除去され、海藻臭を必要としない、食品又は飲料への使用において特に優れている。

本発明に用いるフコイダンは食用海藻やナマコ、すなわち食用のフコイダン含有物を原料として大量に供給でき、その安全性も極めて高い。

本発明の食品又は飲料とは、特に限定はないが、例えば穀物加工品（小麦粉加工品、でんぷん類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅等）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシング等）、大豆加工品（豆腐

類、味噌、納豆等)、食肉加工品(ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージ等)、水産製品(冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮等)、乳製品(原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリーム等)、野菜・果実加工品(ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料等)、菓子類(チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類等)、アルコール飲料(日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウオッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュール等)、嗜好飲料(緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料等)、調味料(しょうゆ、ソース、酢、みりん等)、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品(牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品)、半乾燥又は濃縮食品(レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類)、乾燥食品(即席面類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスープ等)、冷凍食品(すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種スティック、フルーツカクテル等)、固形食品、液体食品(スープ等)、香辛料類等の農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品等が挙げられる。

本発明の飲食品を製造する方法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料にフコイダンが含有されていれば良く、また食品又は飲料に有効量のアポトーシス誘発性を有するフコイダンを含むことによりアポトーシス誘発性の食品又は飲料を提供することができる。

調理及び加工においては、調理・加工前、調理・加工時、更には調理・加工後にフコイダンを添加しても良いし、調理及び加工品やその材料をフコイダンへ添加し、フコイダンを希釈しても良い。食品又は飲料の製造においては、任意の工程で、フコイダンを添加しても良いし、食品又は飲料やその原料をフコイダンへ

添加し、フコイタンを希釈し、食品又は飲料に含有させても良い。また、添加は1回又は数回に渡って行ってもよい。したがって、簡便に新規な食品又は飲料、又は有効量のフコイタンを含有するアポトーシス誘発作用を有するアポトーシス誘発性食品又は飲料を製造することができる。いずれの工程を経た場合も、フコイタンを含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料、又はフコイタンを含有、添加及び／又は希釈してなり、有効量のフコイタンを含有するアポトーシス誘発性食品又は飲料は本発明の食品又は飲料と定義される。

次にフコイタンの食品への添加量をモデル飲料で検討した。

検討例 1

飲料のモデル試験を行うため、pH 3.8の0.01M乳酸緩衝液を用意し、市販のショ糖を5w/v%になるように溶解してショ糖液を調製した。実施例1のフコイタンIIを用い、フコイタン含量0（対照）、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、100、150及び200mgw/v%を添加して、フコイタン入りショ糖液を舌ざわり感のまろやかさ、なめらかさ、のどごし感及び味のバランスについて食感面から官能評価した。パネラー20名で、5段階評価（5良、1悪）で実施し、その結果の平均値を表1に示した。

表 1 モデル飲料の官能評価

フコイダン 添加量 (mgw/v%)	舌ざわり感		のどごし感	味との バランス	食感の総合
	まろやかさ	なめらかさ			
0	1. 2	1. 4	1. 6	1. 5	1. 4
0. 1	1. 6	1. 7	1. 7	1. 6	1. 6
0. 5	2. 0	1. 9	1. 8	1. 7	1. 8
1	2. 1	2. 2	2. 0	1. 9	2. 0
5	2. 5	2. 6	2. 7	2. 8	2. 6
10	3. 5	3. 6	3. 4	3. 8	3. 6
20	4. 0	4. 2	4. 1	4. 5	4. 2
30	4. 5	4. 7	4. 3	4. 5	4. 5
40	4. 6	4. 7	4. 3	4. 6	4. 6
50	4. 7	4. 7	4. 5	4. 8	4. 7
100	4. 3	4. 6	4. 6	4. 8	4. 6
150	4. 0	3. 9	3. 2	3. 8	3. 7
200	3. 8	3. 6	3. 1	3. 6	3. 5

表 1 より、官能評価の舌ざわり感、のどごし感、味とのバランスの面からは、フコイダン添加、すなわち 0. 1 mgw/v% 以上で効果が認められた。

検討例 2

実施例 1 のフコイダン 1130 mgw/v% 添加のモデル飲料へ海藻由来のアルギン酸を 0 (対照)、5、10、20、30、40、60、80、100、150 及び 200 mgw/v% 添加してフコイダン及びアルギン酸の存在比が食感に

及ぼす影響について、検討例 1 と同様にして官能評価を行い、その結果の平均値を表 2 に示した。

表 2 フコイダン及びアルギン酸の官能評価への影響

アルギン 酸添加 (mg w / v %)	フコイ ダン	フコイダ ン比率* (%)	舌ざわり感		のどご し感	味との バランス	食感の 総合
			まろや かさ	なめら かさ			
0	30	100	4.5	4.7	4.3	4.5	4.5
5	30	85	4.5	4.6	4.2	4.5	4.4
10	30	75	4.3	4.5	4.2	4.5	4.4
20	30	60	4.2	4.4	4.1	4.5	4.3
30	30	50	4.2	4.4	4.1	4.4	4.3
40	30	43	4.0	4.1	3.7	3.9	3.9
60	30	33	3.5	3.6	3.1	3.2	3.3
80	30	27	3.2	3.3	3.2	3.1	3.2
100	30	23	3.2	3.1	3.0	3.1	3.1
					やや舌に残る		
150	30	17	2.9	2.8	2.5	3.0	2.8
					やや舌に残る		
200	30	13	2.7	2.6	2.3	2.6	2.6
					やや舌に残る		

* フコイダン / (アルギン酸 + フコイダン) (%)

表 2 より、モデル飲料におけるフコイダン添加単独の場合が食感に及ぼす効果

の官能評価が最も高く、アルギン酸及びフコイダンの重量の合計値に対するフコイダンの重量の比（フコイダン比率と以後略称）が小さくなるにつれ、食感の評価が低下した。フコイダン単独で10mgw/vの添加効果がみられるのは、官能評価値からは、フコイダン比率43%以上であった。また、フコイダン単独で5mgw/v%以上の官能評価値からはフコイダン比率13%以上であったが、やや舌に残る食感を感じないのは27%以上であった。

本発明のフコイダンの食品又は飲料中の含有量は特に制限されず、その官能と生理活性の点より適宜選択できるが、例えばシステイン-硫酸法による方法で、食品又は飲料100部当りフコース換算重量として0.001部以上、食品としての官能又は飲料としての食味、アポトーシス誘発作用の面及びコストの面からは好ましくは0.005～10部、更に好ましくは0.01～1.0部である。なお、本明細書において部は重量部を意味する。

本発明の食品又は飲料としては、本発明のフコイダンを含むすれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

本発明の食品又は飲料は生理活性を有するフコイダンを有効量含有し、該フコイダンの有するアポトーシス誘発作用等によって、これらを摂取することにより発癌予防、癌抑制効果等を有する健康食品又は飲料であり、特に胃腸健康保持に有用な食品又は飲料である。

本発明において、フコイダンとは、分子中にフコース硫酸を含有する多糖及び/又はその分解物であり、特に限定はない。なお褐藻植物由来のフコース含有多糖が通常フコイダン、フコイジン、フカンと通称され、いくつかの分子種があることが知られているが本発明のフコイダンはこれらを包含するものである。

フコイダンの分解方法としては酸処理等の化学的に分解する方法、超音波処理など物理的に分解する方法、酵素的に分解する方法、あるいは微生物分解方法等

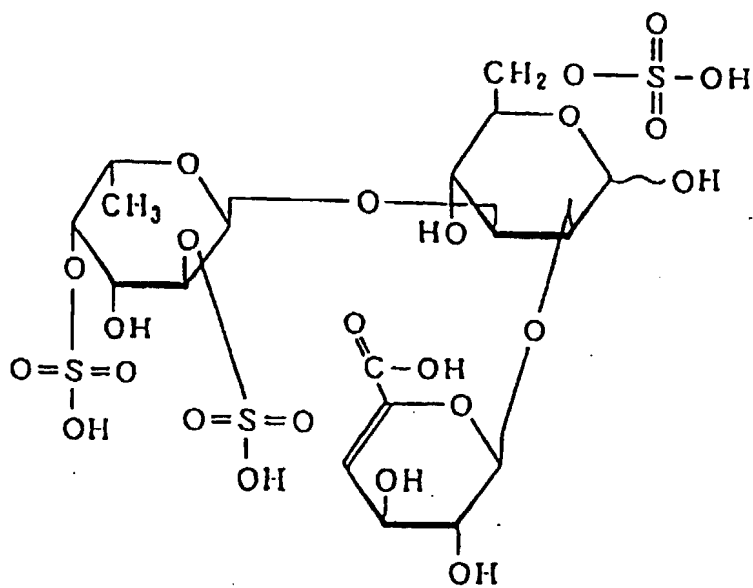
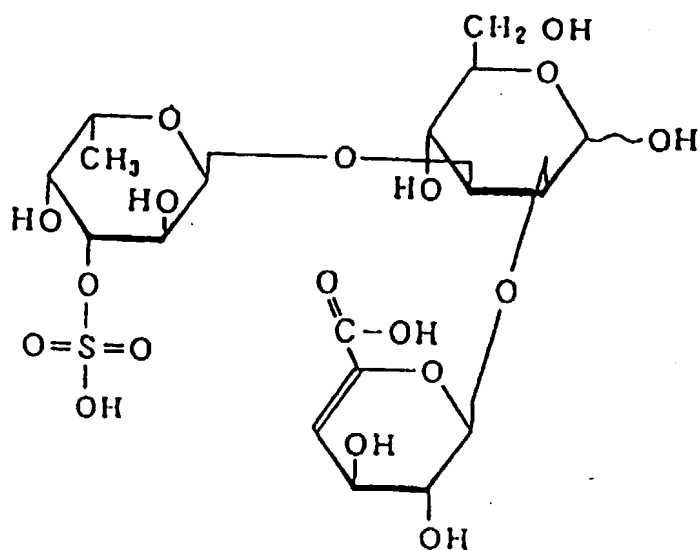
が挙げられ、本発明においては分子中にフコース硫酸を含有し、アポトーシス誘発作用を有するフコイダン分解物を使用することができる。

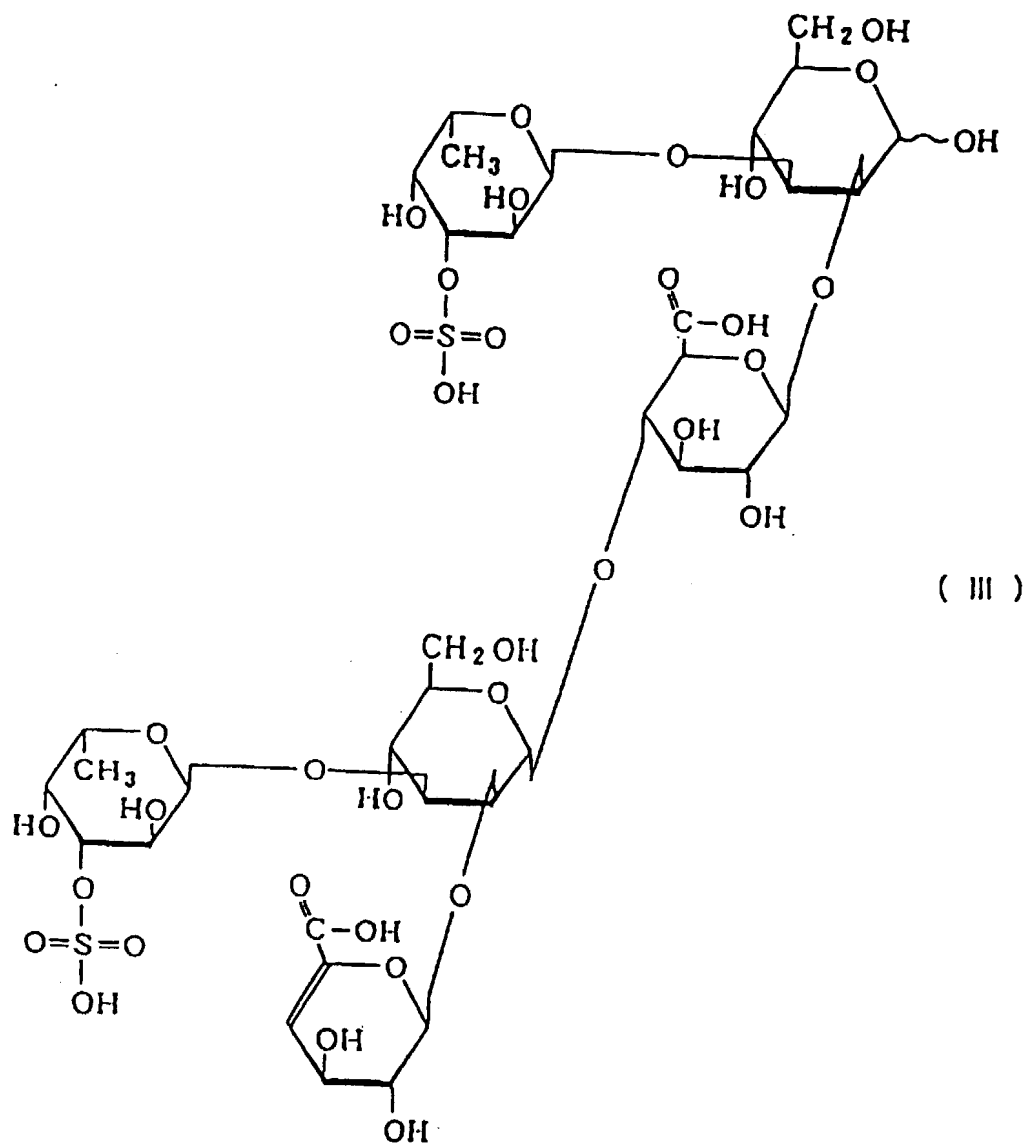
該フコイダン分子種の中にはフコースを主成分とする一群と、ウロン酸を数% 含み構成糖にフコースやマンノースを多く含む一群の分子種がある。以下、本明細書においてはウロン酸を実質的に含まない方をフコイダン-Fと称し、ウロン酸を含むフコイダンをフコイダン-Uと称し、両者の混合物を単にフコイダンと記載する。

本発明においてはフコイダン-Fとフコイダン-Uをそれぞれ単独で用いても良く、また併用して用いても良い。すなわち、純化されたフコイダン-F、フコイダン-Uを構成成分とする食品又は飲料は本発明に包含されるものであり、これらのフコイダン、特にフコイダン-U含量が増加された食品又は飲料は強い健康増強効果を有するものである。

本発明のフコイダン含有天然物由来抽出物は、例えば実施例4に記載のように調製した下記理化学的性質のフコイダン-Uを含有する。

- (1) 構成糖：ウロン酸を含有する。
- (2) フラボバクテリウム (Flavobacterium) sp. SA-0082 (FERM BP-5402) の生産するフコイダン分解酵素により低分子化し、少なくとも下記式 (I)、(II)、(III) で表される化合物より選択される一種以上の化合物が生成する。





本発明のフコイダン含有天然物由来抽出物は、例えば実施例 5 に記載のように調製した下記理化学的性質のフコイダン-F を含有する。

(1) 構成糖：ウロン酸を実質的に含有しない。

(2) フラボバクテリウム (Flavobacterium) sp. SA-0082 (FERM BP-5402) の生産するフコダイニン分解酵素により実質上低分子化されない。

フコイダンをフコイダン分解性の微生物、例えば上記フコイダン分解酵素生産性のフラボバクテリウム (Flavobacterium) sp. SA-0082 (FERM BP-5402) により処理することにより、フコイダンの微生物分解物を調製することができる。

また上記フコイダン-U をフコイダン分解酵素、例えばフラボバクテリウム (Flavobacterium) sp. SA-0082 (FERM BP-5402) の生産するフコイダン分解酵素で処理することにより、フコイダン-U の酵素分解物を調製することができる。またこれらの分解物より、各々の分解物の分子量分画物を調製することができる。これらのフコイダン分解物を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料も本発明の食品又は飲料である。

本発明の食品又は飲料が含有するフコイダンの一例の海藻由来抽出物を製造するに際しては、海藻としては、紅藻類例えば海苔、てんぐさ、おごのり等、緑藻類例えばあおさ、褐藻類例えばかじめ、あらめ、もずく、ひじき、わかめ、ガゴメ昆布、マ昆布等が用いられ、本発明においては特にフコイダン高含有藻類が適している。

本発明において使用する海藻は、例えば褐藻類等のフコイダン高含有藻類を、例えばそのまま乾燥、粉碎して抽出に用いても良く、またその生鮮物を細断して抽出に用いても良い。

抽出はフコイダンが効率よく抽出される条件であればいかなる方法であっても良い。

なお海藻抽出物の製造において、海藻を水洗する工程、海藻をアルコール又は含水アルコール洗浄する工程を包含しても良く、海藻の抽出をアルコール存在下

で行っても良い。

本発明においては、例えば海藻のカルシウム塩溶液、例えば塩化カルシウム溶液による抽出操作を行い、海藻の塩化カルシウム抽出液を調製する。

抽出は乾燥海藻 1 部に対し、塩化カルシウム溶液 10～1000 部で行うのが好ましく、塩化カルシウム濃度は 25 mM 以上で行うのが好ましい。

なお生鮮海藻を使用する場合は生鮮海藻 1 部に対し、塩化カルシウム溶液 1～100 部で行うのが好ましく、塩化カルシウム濃度は 25 mM 以上で行うのが好ましい。

抽出は、50～130℃の範囲で、10～180 分の範囲で行うのが好ましい。抽出条件としては、抽出液中のアルギン類が低減され、フコイダンが効率よく抽出される条件であればよい。

海藻のカルシウム塩抽出の終了後、不溶性成分が除去される。不溶性成分の除去方法としては、遠心分離方法、ろ過方法等より選択すればよい。不溶性成分除去液中のカルシウム塩は例えば限外ろ過方法、イオン交換方法等で除去することができる。カルシウム塩の除去液は活性炭処理、イオン交換処理等を行うことによって更にその海藻臭を選択的に除去することができる。

本発明においては、例えば海藻のアルカリ性溶液、例えば炭酸ナトリウム溶液による抽出操作を行い、海藻の炭酸ナトリウム抽出液を調製する。次に該抽出液にカルシウム塩、例えば塩化カルシウムを添加し、生成する不溶成分を除去し、海藻由来抽出物の可溶性画分を調製する。

抽出は海藻 1 部に対し、炭酸ナトリウム溶液 10～600 部で行うのが好ましく、炭酸ナトリウム濃度は 0.1～5%で行うのが好ましい。

なお生鮮海藻を使用する場合は生鮮海藻 1 部に対し、炭酸ナトリウム溶液 1～60 部で行うのが好ましく、炭酸ナトリウム濃度は 0.1～5%で行うのが好ましい。

抽出は、50～130℃の範囲で、10～180 分の範囲で行うのが好ましい

。抽出条件としては、抽出液中のフコイダンが効率よく抽出される条件であればよい。なお本明細書において％は重量％を意味する。

海藻の炭酸ナトリウム抽出の終了後、カルシウム塩、例えば塩化カルシウムを添加し、生成する不溶性成分を除去する。塩化カルシウムの添加量としては炭酸ナトリウム抽出液に対し、アルギン類の沈殿が生じなくなるまでの量を添加すれば良く、抽出液中のアルギン類を効率よく沈殿させる条件であればよい。生成する不溶性成分の除去方法としては、遠心分離方法、ろ過方法等より選択すればよい。不溶性成分除去液中の塩類、例えば炭酸ナトリウム、塩化カルシウムは、例えば限外ろ過方法、イオン交換方法等で除去することができる。塩類除去液は活性炭処理、イオン交換処理等を行うことによって更にその海藻臭を選択的に除去することができる。

本発明においては、例えば海藻のアルカリ性溶液、例えば炭酸ナトリウム溶液による抽出操作を行い、海藻の炭酸ナトリウム抽出液を調製する。次に酸、例えば希硫酸を使用し酸性とし、生成する不溶性成分を除去し、海藻由来抽出物の可溶性物を調製する。

海藻の炭酸ナトリウム溶液による抽出は上記に準じ行う。

海藻の炭酸ナトリウム溶液による抽出の終了後、抽出液に酸溶液、例えば希硫酸溶液を添加し、生成する不溶性成分を除去する。希硫酸の添加量としては炭酸ナトリウム抽出液がpH 1～2.5となるまで添加すれば良く、抽出液を酸性とし抽出液中のアルギン類を効率よく沈殿させる条件であればよい。生成する不溶性成分の除去方法としては、遠心分離方法、ろ過方法等より選択すればよい。不溶性成分除去液中の塩類は例えば限外ろ過方法、イオン交換方法等で除去することができる。塩類除去液は必要に応じ中和処理を行っても良く、酸性溶液、中和溶液等の活性炭処理、イオン交換処理等を行うことによって、更にその海藻臭を選択的に除去することができる。

本発明のフコイダンは液状でも良く、固形物でも良い。固形物を製造するに際してはスプレードライ法、凍結乾燥法等の公知の乾燥方法より適宜選択すればよ

い。

なお一般にフコイダンは酸やアルカリに対して弱いため、酸性溶液やアルカリ性溶液を使用する場合低分子化が進行し易い。加熱温度、時間、pH等を調整することにより、任意の分解物を調製することができ、例えばゲルろ過処理、分子量分画膜処理等により、分解物の平均分子量、分子量分布等を調整することができる。またフコイダンの分子量及び糖組成はフコイダンの原料の収穫期、該原料の乾燥方法、該原料の保存方法により異なり、またフコイダンの抽出時の加熱条件、pH条件等により異なる。例えば酸によりフコイダンは加水分解され、アルカリ条件下ではウロン酸の β -脱離により、低分子化が進行する。従って本明細書に記載したフコイダン-U、フコイダン-Fの場合においてもその分子量、分子量分布はその1例にすぎず、フコイダンの処理条件により、その分子量、分子量分布は容易に変化させ得る。例えば、弱アルカリ性で100℃、1時間加熱し、脱塩に際し、ポアサイズ300の分子ふるい膜を使用すれば、分子量分布1000から1万程度のフコイダン、フコイダン-U、フコイダン-F等が調製できる。使用する条件によって任意の分子量、分子量分布のフコイダンを調製でき、本発明のフコイダンとして使用することができる。

本発明のフコイダン及び／又はその分解物を癌細胞の培養液に添加すれば、添加後1日から数日で癌細胞がアポトーシスを起こす。また、正常細胞に対しては毒性を示さない。特に、食用海藻由来のフコイダン及び／又はその分解物は安全性が高い。

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

実施例1

(1) ガゴメ昆布を十分乾燥後、乾燥物20kgを自由粉碎機（奈良機械製作所製）により粉碎した。

水道水 900 リットルに塩化カルシウム二水和物（日本曹達社製） 7.3 kg を溶解し、次にガゴメ昆布粉砕物 20 kg を混合した。液温 12℃ から液温 90℃ となるまで水蒸気吹き込みにより 40 分間昇温させ、次いでかくはん下 90～95℃ に 1 時間保温し、次いで冷却し、冷却物 1100 リットルを得た。

次いで固液分離装置（ウエストファリアセパレーター社製 CNA 型）を用い、冷却物の固液分離を行い、約 900 リットルの固液分離上清液を調製した。

固液分離上清液 360 リットルをダイセル社製 FE10-FC-FUS0382（分画分子量 3 万）を用い、20 リットルまで濃縮した。次いで水道水を 20 リットル加え、また 20 リットルまで濃縮するという操作を 5 回を行い、脱塩処理を行い、フコイダンを高含有する海藻由来抽出物溶液 25 リットルを調製した。

抽出物溶液の pH は約 6.5、酸度は 0.06 ml、糖度は 0.8 Brix %、Ca 濃度は 1200 ppm であった。

該溶液 1 リットルを凍結乾燥し、乾燥物 13 g を得た。凍結乾燥物中に、フコイダンは 65 %、フコイダン-U は 33 % 含有されていた。

フコイダン-U 含量は実施例 4 で調製したフコイダン-U を標準物質として HPLC で測定した。

なおフコイダン含量は実施例 5 で調製したフコイダン標準物質の水溶液（0.4 mg/ml）を標準液として、以下に示す硫酸-システイン法で算出した。

被検液 200 μ l を試験管にとり、これに 900 μ l の濃硫酸：水 = 6：1 溶液を氷冷中で冷却しながら添加し、十分に冷却後、かくはんする。約 20℃ で 3 分間保持した後、沸騰水浴中で 10 分間加熱する。加熱後氷水中で冷却し、3 % システイン-塩酸 20 μ l を添加、かくはんする（発色区）。なお対照として水 20- μ l を添加、かくはんする（ブランク）。かくはん後 1 時間放置し 400 nm、460 nm の吸光度をそれぞれ測定する。

被検液中のフコイダン含量は下記式にて算出する。

$$\text{含量 (mg/ml)} = \frac{\text{被検液} [\text{発色区} (A_{400} - A_{460}) - \text{ブランク} (A_{400} - A_{460})] / \text{標準液} [\text{発色区} (A_{400} - A_{460}) - \text{ブランク} (A_{400} - A_{460})] \times \text{希釈倍数}}{20.4}$$

なお式中において、 A_{400} は400nmの吸光度、 A_{460} は460nmの吸光度である。

またpHはpHメーターで測定し、酸度は試料溶液10mlをpH7.0に中和するのに要する0.1N NaOH量(ml)で表示した。更に糖度はブリックス糖度計で測定し、Ca濃度は原子吸光分析法で測定した。

次いでフコイダン高含有海藻由来抽出溶液に2%活性炭(白鷺:食添用)を添加し30分間処理後、荒ろ過、0.8 μ mのフィルター処理を行い、フィルター処理ろ液(フコイダンI)を調製した。次にそのろ液の半量を120℃で60分間、加圧加熱処理し、熱処理液(フコイダンII)を調製した。

フィルター処理ろ液を凍結乾燥し、その乾燥物10mgを1%Na₂CO₃、100mM CaCl₂の10mlにそれぞれ懸濁した。両溶液において乾燥物は完全に溶解し、アルギン類の混入は認められなかった。

(2) ガゴメ昆布を十分乾燥後、乾燥物20kgを粉砕機(ホソカワミクロン社製:フィッツミル)により粉砕した。

水道水400リットルに塩化カルシウム二水和物(日本曹達社製)7.2kgを溶解し、次にガゴメ昆布粉砕物20kgを混合した。かくはん下、液温28℃から液温95℃となるまで水蒸気吹き込みにより95分間昇温させ、次いでかくはん下95℃に2時間保温し、次いで冷却し、冷却物500リットルを得た。

次いで固液分離装置(タナベウエルテック社製)を用い、冷却物の固液分離を行い、約450リットルの固液分離上清液を調製した。

固液分離上清液をダイセル社製FE10-FC-FUS0382(分画分子量3万)を用い、40リットルまで濃縮した。次いで無菌ろ過水を通過速度40～

60リットル／hrとなるよう連続添加し、導電率 1.0 mS/cm^2 となるまで脱塩処理を行い、フコイダンを高含有する海藻由来抽出物溶液40リットルを調製した。

次いでフコイダン高含有海藻由来抽出溶液にろ過助剤として、セライト#545（セライト社製）0.4kg、及びシリカ#600-S（中央シリカ社製）0.4kgを添加し、次いでセライト#545の0.1kg、及びシリカ#600-Sの0.1kgでプレコートしたコンパクトフィルター（6インチ16段、ろ紙：ADVANTEC#327）でろ過を行った。

得られたろ液はプレートヒーター（日阪製作所製）による連続瞬間加熱処理（98℃、60秒）を行った後、冷却し、46リットルのフコイダン高含有海藻由来抽出物溶液（フコイダンV）を調製した。

該抽出物溶液のpHは約7、酸度は0ml、糖度は1.2Brix%、Ca濃度は920ppm、固形分1.2%、フコイタン含量は17mg/mlであった。なおアルギン酸、ヨウ素は検出されなかった。

アルギン酸含量は市販のアルギン酸を標準物質としてHPLCで測定した。

フコイタン含量は実施例5で調製したフコイタン標準物質の水溶液（0.4mg/ml）を標準液として硫酸-システイン法で算出した。

また導電率は導電率計で測定した。ヨウ素は臭素で分離させ、チオ硫酸ナトリウムで滴定した。固形分は遠心エバポレーター（60℃、18時間）処理後の乾燥重量より求めた。

（3）ガゴメ昆布を十分乾燥後、乾燥物20kgを粉碎機（ホソカワミクロン社製：フィッツミル）により粉碎した。

水道水400リットルに塩化カルシウム二水和物（日本曹達社製）7.3kgを溶解し、次にガゴメ昆布粉碎物20kgを混合した。かくはん下、液温28℃から液温95℃となるまで水蒸気吹き込みにより95分間昇温させ、次いでかくはん下95℃に2時間保温し、次いで冷却し、冷却物500リットルを得た。

次いで固液分離装置（タナベウエルテック社製）を用い、冷却物の固液分離を行い、約450リットルの固液分離上清液を調製した。

固液分離上清液をダイセル社製FE10-FC-FUS0382（分画分子量3万）を用い、40リットルまで濃縮した。次いで無菌ろ過水を通過速度30リットル/hとなるよう連続添加し、導電率 1.0 mS/cm^2 となるまで脱塩処理を行い、フコイタンを高含有する海藻由来抽出物溶液34リットルを調製した。

次にペクチン（ポモシンペクチンLM-13CG：ハーキュリーズ社製）1.1kgを水道水20リットルに添加し、液温 28°C から液温 120°C となるまで水蒸気吹き込みにより35分間昇温させ、次いでかくはん下で 120°C 、5時間保温し、次いで冷却し、冷却物28リットルを調製した。

次いでフコイタン高含有海藻由来抽出溶液34リットルとペクチンの加熱処理液28リットルを混合し、無水クエン酸（扶桑化学社製）により、pHを3.5に調製した。次にろ過助剤として、セライト#545（セライト社製）0.9kg、及びシリカ#600-S（中央シリカ社製）0.8kgを添加し、次いでセライト#545の0.2kg、及びシリカ#600-Sの0.2kgでプレコートしたコンパクトフィルター（6インチ16段、ろ紙：ADVANTEC#327）でろ過を行った。

得られたろ液に精製水18リットルを添加し、次いでプレートヒーター（日阪製作所製）による連続瞬間加熱処理（ 98°C 、60秒）を行った後、冷却し、80リットルのフコイタン高含有海藻由来抽出物溶液（フコイタンVI）を調製した。

該抽出物溶液のpHは約3.5、酸度は 1.7 ml 、糖度は $2.1\text{ Brix}\%$ 、Ca濃度は 710 ppm 、固形分 2.0% 、フコイタン含量は 13 mg/ml 、フコイダン-U含量は 6.6 mg/ml であった。なおアルギン酸、ヨウ素は検出されなかった。

該溶液 1 リットルを凍結乾燥し、乾燥物 20 g を得た。

実施例 2

マ昆布生鮮物を細断し、得られた細断物 200 g を 600 ml の 1% 炭酸ナトリウム水溶液に懸濁し 60℃ で 1 時間処理後、水を加え 1 リットルとした。この溶液を遠心分離して上清を集め水を加えて 4 リットルとした。

この溶液に 500 mM の塩化カルシウムをこれ以上沈殿が生じなくなるまで添加し、生じた沈殿をろ紙で除去した。得られたろ液を濃縮後、マイクロアシライザーで脱塩し、脱塩液 3.6 リットルを調製した。その半量を凍結乾燥してフコイダン高含有海藻由来抽出物画分 2.1 g (フコイダン III) を得た。次に脱塩液の残りの半量を 2% 活性炭処理した後、120℃ で 60 分間、加圧加熱処理し、熱処理液 (フコイダン IV) を調製した。

上記凍結乾燥物の 10 mg を 1% Na_2CO_3 、100 mM CaCl_2 の 10 ml にそれぞれ懸濁した。両溶液において該画分は完全に溶解し、アルギン類の混入は認められなかった。

実施例 3

実施例 1、実施例 2 でそれぞれ調製したフコイダン高含有海藻由来抽出物のアポトーシス誘発作用

56℃、30 分間処理した牛胎児血清 (JRH バイオサイエンス社) を 10% 含む RPMI 1640 培地 (ギブコ社製) にて 37℃ で培養したヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 (ATCC CCL-240) を ASF 104 培地 (味の素社製) にて 5×10^5 コ / 9 ml となるように懸濁した。この懸濁液 9.0 ml に対し、実施例 1、実施例 2 でそれぞれ調製したフコイダン高含有海藻由来抽出物 (フコイダン I、フコイダン III) のそれぞれの溶液 [5 mg / ml となるよう 100 mM の塩化ナトリウムを含む 50 mM ヘプス緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、121℃、20 分滅菌したもの] を 1 ml 添加し、37℃、5% 二酸化炭素存在下で 18 時間培養した。培養した各細胞を遠心分離により上清と分離した

。得られた細胞を10 mMのエチレンジアミンテトラアセテート及び0.5%のナトリウムラウロイルサルコシネートを含む50 mMのトリス塩酸緩衝液(pH 7.8) 20 μ lにて懸濁し、10 mg/mlのリボヌクレアーゼA(シグマ社製)を1 μ l添加して50℃、30分間処理した後、10 mg/mlのプロテイナーKを1 μ l添加して50℃、1時間処理した。処理後の細胞をサンプルとして、2%のアガロースゲルを用いて100 Vの定電圧の下で電気泳動を行った。このゲルをエチジウムブロミド溶液に30分間浸した後、トランスイルミネータを用いてゲル中のDNAの状態を確認したところ、アポトーシスに特有のDNAラダーが確認された。

この結果より、HL-60細胞は実施例1、実施例2でそれぞれ調製したフコイダン高含有海藻由来抽出物でアポトーシスが誘発されることが明らかとなった。

また実施例1、実施例2でそれぞれ調製したフコイダン高含有海藻由来抽出物(フコイダンII、フコイダンIV)をそれぞれ5 mg/mlとなるよう生理食塩水に溶解し、121℃、20分滅菌処理をした溶液を被検液として用い、上記の方法に準じアポトーシス誘発作用を測定し、各被検液について同様の効果を確認した。

次に、56℃、30分間処理した牛胎児血清(JRHバイオサイエンス社)を10%含むRPMI 1640培地(ギブコ社製)にて37℃で培養したヒト前骨髄性白血病細胞HL-60をASF 104培地(味の素社製)にて 2.5×10^5 コ/4.5 mlとなるように懸濁した。この懸濁液4.5 mlに、実施例1、実施例2でそれぞれ調製したフコイダン高含有海藻由来抽出物(フコイダンI、フコイダンIII) [2 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/mlとそれぞれなるよう100 mMの塩化ナトリウムを含む50 mMヘプス緩衝液(pH 7.2)に溶解し、121℃、20分滅菌したもの]をそれぞれ0.5 ml添加し、37℃、5%二酸化炭素存在下で培養した。培養開始24時間後及び44時間後に培養液を0.5 mlサンプリングし、培地中の生細胞数を「組織培養の技術」(第

2版) (朝倉出版、日本組織培養学会編、1990年11月1日発刊、第26～28頁) 記載の方法に従って計測した。すなわち、血球計算板上のトリパンブルー染色による方法で計測した。

得られた結果を図2～図4に示す。図2は各フコイダン0.2mg/ml存在下での細胞増殖を示す図であり、縦軸は培養液1ml当りの生細胞数($\times 10^4$ コ/ml、以下同じ)、横軸は培養時間(時間)を示す。図3は各フコイダン0.5mg/ml存在下での細胞増殖を示す図であり、縦軸は培養液1ml当りの生細胞数、横軸は培養時間(時間)を示す。図4は各フコイダン1mg/ml存在下での細胞増殖を示す図であり、縦軸は培養液1ml当りの生細胞数、横軸は培養時間(時間)を示す。各図において白三角印は実施例1で調製したフコイダン高含有海藻由来抽出物(フコイダンI)存在下での各時間の生細胞数、白四角印は実施例2で調製したフコイダン高含有海藻由来抽出物(フコイダンIII)存在下での各時間での培養液中の生細胞数を示す。なお対照(試料無添加)の培養液中の生細胞数は培養24時間後で 1.5×10^6 コ/ml、44時間後で 3.1×10^6 コ/mlであった。

図2～図4に示すようにフコイダン高含有海藻由来抽出物は培地中濃度が少なくとも $200 \mu\text{g/ml}$ 以上あれば、HL-60細胞を2日以内にアポトーシスにより死滅させることができた。

また実施例1、実施例2でそれぞれ調製したフコイダン高含有海藻由来抽出物(フコイダンII、フコイダンIV、フコイダンV、フコイダンVI)をそれぞれ2～10mg/mlとなるよう生理食塩水に溶解し、 121°C 、20分滅菌処理をした溶液を被検液として用い、上記の方法に準じアポトーシス誘発作用を測定し、各被検液について同様の効果を確認した。

実施例4 フコイダン-Uの調製

ガゴメ昆布を十分乾燥後、2kgを自由粉碎機(奈良機械製作所製)により粉碎し、得られた乾燥粉末を9リットルの80%エタノールに懸濁し 80°C 、2時

間処理した。処理後ろ紙によりろ過し残渣を得た。この残渣に対して上記エタノール洗浄、ろ過という操作を3回繰り返しエタノール洗浄残渣を得た。この残渣を36リットルの0.2M酢酸カルシウム溶液に懸濁後、95℃、2時間処理し、ろ過した。残渣を4リットルの0.2M酢酸カルシウム溶液で洗浄し、ガゴメ昆布のフコイダン抽出液36リットルを得た。

このろ液を排除分子量10万の限外ろ過膜を装着した限外ろ過器により2リットルに濃縮し、次に、終濃度が1.5Mとなるように食塩を添加し5%の塩化セチルピリジニウムをこれ以上沈殿が生じなくなるまで添加した。生じた沈殿を遠心分離により除去した。得られた上清を限外ろ過により1リットルに濃縮し、4リットルのエタノールを添加し、生じた沈殿を遠心分離により集めた。この沈殿に100mlの4M食塩水を添加し、良くかくはん後エタノールを80%となるように添加し、かくはん後遠心分離により沈殿を得た。この沈殿を80%エタノール中に懸濁し遠心分離するという操作を、上清中の260nmの吸光度がなくなるまで繰り返した。この沈殿を2Mの食塩水2リットルに溶解し、不溶物を遠心分離により除去後、50mlのDEAE-セルロファインA-800（生化学工業社製）を添加し、かくはん後、加えた樹脂をろ過により除去した。ろ液を2Mの食塩水で平衡化したDEAE-セルロファインA-800カラムにかけ非吸着分を排除分子量10万以下のホロファイバーを備えた限外ろ過装置で限外ろ過し、着色性物質及び食塩を完全に除去後、遠心分離及びろ過により不溶性物質を除去し、凍結乾燥し、フコイダン-Uを調製した。凍結乾燥フコイダン-Uの重量は15gであった。

このフコイダン-U及び下記実施例5で調製したフコイダン-Fの各塩化ナトリウム濃度における、過剰量の塩化セチルピリジニウム存在下における沈殿形成性を図1に示す。

図1の縦軸は沈殿形成率（%）を示し、横軸は塩化ナトリウム濃度（M）を示す。図1中、実線及び白丸印は本発明のフコイダン-Uの各塩化ナトリウム濃度での沈殿形成率を示し、図1中、点線及び白三角印はフコイダン-Fの各塩化ナ

トリウム濃度 (M) での沈殿形成率を示す。

沈殿形成率の測定は、溶液温度 37℃にて、以下のように行った。

フコイダン-U及びフコイダン-Fをそれぞれ2%の濃度で水及び4Mの塩化ナトリウムに溶解し、これらを様々な割合で混合することにより様々な濃度の塩化ナトリウムに溶解したフコイダン-U及びフコイダン-F溶液を各125 μ lずつ調製した。次に、塩化セチルピリジニウムを2.5%の濃度で水及び4Mの塩化ナトリウムに溶解し、それらを混合することにより様々な濃度の塩化ナトリウムに溶解した1.25%の塩化セチルピリジニウム溶液を調製した。

水に溶解している2%のフコイダン-U及びフコイダン-Fを1.25%の塩化セチルピリジニウムで完全に沈殿させるには容量で3.2倍必要であった。そこで、各濃度の塩化ナトリウムに溶解した2%のフコイダン-U及びフコイダン-Fの各125 μ lに対して各々の濃度の塩化ナトリウムに溶解した塩化セチルピリジニウム溶液を400 μ l添加後、十分かくはんし、30分放置後、遠心分離し上清中の糖含量をフェノール-硫酸法〔アナリティカル ケミストリー (Analytical Chemistry)、第28巻、第350頁(1956)〕により測定し、各塩化ナトリウム濃度下での各フコイダンの沈殿形成率を算出した。

得られたフコイダン-Uの分子量をセファクリルS-500を用いたゲルろ過法により求めたところ、約19万を中心とした分子量分布を示した。

次に、フコイダン-Uの成分を分析した。

まず、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第175巻、第595頁(1948)の記載に従いフコース量を定量した。

次に、得られたフコイダン-Uの乾燥標品を1規定の塩酸に0.5%の濃度で溶解し、110℃で2時間処理し、構成単糖に加水分解した。次に、グライコタグ (GlycoTAG) 及びグライコタグ リージェント キット (Glycotag Reagent Kit) (共に宝酒造社製) を用いて加水分解して得られた単糖の還元性末端をピリジル- (2) -アミノ化 (PA化) し、HPLCにより構成糖の比率を調べ

た。

次に、アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第4巻、第330頁(1962)の記載に従いウロン酸量を定量した。

次に、バイオケミカル ジャーナル (Biochemical Journal)、第84巻、第106頁(1962)の記載に従い硫酸含量を定量した。

以上の結果、フコイダン-Uの構成糖はフコース、マンノース、ガラクトース、グルコース、ラムノース、キシロース、ウロン酸であった。

その他の中性糖は実質的に含有されていなかった。また、主要成分のフコース：マンノース：ガラクトース：ウロン酸：硫酸基はモル比で約10：7：4：5：20であった。

フコイダン-Uの構造は以下のように決定した。

フコイダン-Uを分解する能力を有する分解酵素によるフコイダン-Uの分解及び分解物の精製

精製したフコイダン-Uに下記エンド型フコイダン分解酵素を作用させ分解物の精製を行った。

すなわち、1%のフコイダン-U溶液16mlと、50mMのリン酸緩衝液(pH8.0)12mlと4Mの塩化ナトリウム4mlと32mU/mlの下記エンド型フコイダン分解酵素溶液8mlを混合し、25℃で48時間反応させた。反応の進行と共に230nmの吸光度が増加することを確認し、本酵素によりフコイダン-Uが分解されていることが判明した。

この反応液をマイクロアシライザーG3(旭化成社製)により脱塩後、DEAEセファロースFFにより3つの画分(a)、(b)、及び(c)に分離精製した。

なお、上記のエンド型フコイダン分解酵素は以下の方法により調製される。

該エンド型フコイダン分解酵素の生産に用いる菌株としては、該エンド型フコイダン分解酵素生産能を有する菌株であればいかなる菌株でもよいが、具体例と

しては、例えばフラボバクテリウム (Flavobacterium) sp. SA-0082 株 (FERM BP-5402) が挙げられる。

本菌株は青森県の海水中より新たに検索して得た菌株で、この菌株は Flavobacterium sp. SA-0082 と表示され、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 [日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305)] に平成7年3月29日より FERM P-14872 として寄託され、前記通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM BP-5402 (国際寄託への移管請求日: 平成8年2月15日) として寄託されている。

本菌株の培地に加える栄養源は使用する菌株が利用し、エンド型フコイダン分解酵素を生産するものであればよく、炭素源としては例えばフコイダン、海藻粉末、アルギン酸、フコース、グルコース、マンニトール、グリセロール、サッカロース、マルトース、ラクトース、デンプン等が利用でき、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、コーンステープリカー、肉エキス、脱脂大豆、硫安、塩化アンモニウム等が適当である。その他にナトリウム塩、リン酸塩、カリウム塩、マグネシウム塩、亜鉛塩等の無機質、及び金属塩類を加えてもよい。

本エンド型フコイダン分解酵素の生産菌を培養するに当り、生産量は培養条件により変動するが、一般に培養温度は、15℃～30℃、培地のpHは5～9がよく、5～72時間の通気かくはん培養で本エンド型フコイダン分解酵素の生産量は最高に達する。培養条件は使用する菌株、培地組成等に応じ、本エンド型フコイダン分解酵素の生産量が最大になるように設定するのは当然のことである。

本エンド型フコイダン分解酵素は菌体中にも培養物上清中にも存在する。

上記のフラボバクテリウム sp. SA-0082 株を適当な培地で培養し、その菌体を集め、通常用いられる細胞破壊手段、例えば、超音波処理などで菌体を破碎すると無細胞抽出液が得られる。

次いで、この抽出液から通常用いられる精製手段により精製酵素標品を得ることができる。例えば、塩析、イオン交換カラムクロマト、疎水結合カラムクロマ

ト、ゲルろ過等により精製を行い、他のフコイダン分解酵素を含まない純化された本エンド型フコイダン分解酵素を得ることができる。

また、上述の培養液から菌体を除去した培養液上清中にも本酵素（菌体外酵素）が大量に存在するので、菌体内酵素と同様の精製手段により精製することができる。

エンド型フコイダン分解酵素の精製例を示す。

フラボバクテリウム sp. SA-0082 (FERM BP-5402) をグルコース 0.25%、ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.05% を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー製）pH 7.5 からなる培地 600 ml を分注して殺菌した（120℃、20分）2 リットルの三角フラスコに接種し、24℃で24時間培養して種培養液とした。グルコース 0.25%、ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.05%、及び消泡剤（信越化学工業製 KM70）0.01% を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー製）pH 7.5 からなる培地 20 リットルを 30 リットル容のジャーファーマンターに入れ 120℃で20分殺菌した。冷却後、上記の種培養液 600 ml を接種し、24℃で24時間、毎分 10 リットルの通気量と毎分 125 回転のかくはん速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を得た。

この菌体を、200 mM の食塩を含む 20 mM の酢酸－リン酸緩衝液（pH 7.5）に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して菌体抽出液を得た。この菌体抽出液中の本発明のエンド型フコイダン分解酵素の活性を測定したところ、培地 1 ml 中に 5 mU の活性が検出された。

本抽出液に、終濃度が 90% 飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、かくはん溶解後遠心分離し、沈殿を上記菌体抽出液と同じ緩衝液に懸濁して、50 mM の食塩を含む 20 mM の酢酸－リン酸緩衝液（pH 7.5）で十分透析した。透析により生じた沈殿を遠心分離により除去後、あらかじめ 50 mM の食塩を含む 20 mM の酢酸－リン酸緩衝液（pH 7.5）で平衡化した DEAE－セファロース FF のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液にて十分洗浄後、50 mM か

ら600 mMの食塩のグラジエントにより溶出させ、活性画分を集めた。次にこの活性画分に終濃度が4 Mとなるように食塩を加え、あらかじめ4 Mの食塩を含む20 mMのリン酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化したフェニルセファロース CL-4 Bのカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で十分洗浄後、4 Mから1 Mの食塩のグラジエントにより溶出させ、活性画分を集めた。次にこの活性画分を限外ろ過器で濃縮後、あらかじめ50 mM食塩を含む10 mMリン酸緩衝液で平衡化したセファクリル S-300でゲルろ過を行い活性画分を集めた。この酵素の分子量をセファクリル S-300の保持時間から求めたところ約46万であった。次にこの活性画分に25 mMの食塩を含む10 mMのリン酸緩衝液 (pH 7) で透析した。この酵素液を、あらかじめ250 mMの食塩を含む10 mMのリン酸緩衝液 (pH 7) で平衡化したモノ (Mono) Q HR 5/5のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で十分洗浄後、250 mMから450 mMの食塩のグラジエントにより溶出させ、活性画分を集め、精製酵素を得た。以上の精製工程を表3に示す。

表 3

工程	総タンパク量 (mg)	総活性 (μ l単位)	比活性 (μ l単位/mg)	収率 (%)
菌体抽出液	61,900	101,000	1.63	100
硫酸塩析	33,800	88,600	2.62	87.7
DEAE-セファロース FF	2,190	40,400	18.4	40.0
フェニルセファロース CL-4B	48.2	29,000	601	28.7
セファクリル S-300	7.24	19,600	2,710	19.4
モノ Q	0.824	15,000	18,200	14.9

本酵素の活性測定は下記のように行う。

2. 5%のガゴメ昆布由来のフコイダン溶液50 μ lと、10 μ lの本酵素と、60 μ lの667mM塩化ナトリウムを含む83mMリン酸緩衝液pH7.5を混合し、37℃、3時間反応させた後、反応液105 μ lと水2mlを混合かくはんし、その230nmにおける吸光度(AT)を測定する。対照として、本酵素の代りに、本酵素を溶解している上記緩衝液のみを用いて同様の条件により反応させたもの及びフコイダン溶液の代りに水のみを用いて反応を行ったものを用意し、それぞれ同様に吸光度を測定する(AB1及びAB2)。

1単位の酵素は、上記反応系において1分間に1 μ molのマノースとウロン酸の間のグリコシド結合を脱離的に切断する酵素量とする。切断された結合の定量は、脱離反応の際に生じた不飽和ウロン酸のミリモル分子吸光係数を5.5として計算し行う。なお、酵素の活性は下記式により求める。

$$(AT - AB1 - AB2) \times 2.105 \times 120 / 5.5 \times 105 \times 0.01 \times 180 = U/ml$$

2. 105 : 吸光度を測定するサンプルの液量 (ml)

120 : 酵素反応液の液量 (μ l)

5.5 : 不飽和ウロン酸の230nmにおけるミリモル分子吸光係数 (/mM)

105 : 希釈に用いる反応液の液量 (μ l)

0.01 : 酵素液量 (ml)

180 : 反応時間 (分)

タンパク質の定量は、酵素液の280nmの吸光度を測定することにより行う。その際1mg/mlのタンパク質溶液の吸光度を1.0として計算する。

なお基質のガゴメ昆布由来のフコイダンは次のように調製した。

乾燥ガゴメ昆布を自由粉碎機M-2型（奈良機械製作所製）により粉碎し、10倍量の85%メタノール中で70℃、2時間処理後、ろ過し、残渣を10倍量のメタノール中で70℃、2時間処理し、ろ過する。残渣に20倍量の水を加え、100℃、3時間処理しろ過により抽出液を得る。抽出液の塩濃度を400mMの塩化ナトリウム溶液と同じにした後、セチルピリジニウムクロリドをこれ以上沈殿が生じなくなるまで添加し、遠心分離する。その沈殿を、エタノールで十分洗浄し、セチルピリジニウムクロリドが完全に除去できたら、限外ろ過器（ろ過膜の排除分子量10万）（アミコン社製）により脱塩及び低分子除去を行い、この際生じた沈殿を遠心分離により除去する。この上清を凍結乾燥して精製ガゴメ昆布フコイダンを得る。

酵素反応生成物の構造解析

上記のエンド型フコイダン分解酵素は、複合多糖中に存在するD-マンノースとD-グルクロン酸の間の $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合を脱離的に分解する酵素であり、フコイダンに作用させると前記式（I）、（II）、及び（III）の構造を有するオリゴ糖を生成する。

そこで、上記のDEAE-セファロースFFで分離精製した3つの画分（a）、（b）、及び（c）をそれぞれ一部だけグライタッグ（GlycoTAG）及びグライコタッグ リージェント キット（GlycoTAG Reagent Kit）（共に宝酒造社製）を用いて還元性末端を、ピリジル-（2）-アミノ化（PA化）し、各PA化糖（PA-a）、（PA-b）、及び（PA-c）を得た。（PA-a）、（PA-b）、及び（PA-c）をHPLCにより分析し、上記式（I）、（II）、及び（III）で表される3種のオリゴ糖のPA化物との相違性を調べた。

なお、HPLCの条件は下記によった。

（ア）分子量分画カラムを用いたHPLC分析

装置：L-6200型（日立製作所製）

カラム：SHODEX SB-803（4.6×250mm）（昭和電工社製）

)

溶離液：0.2 M塩化ナトリウム：ジメチルスルホキシド=9：1

検出：蛍光検出器 F-1150（日立製作所製）にて励起波長320 nm、
蛍光波長400 nmで検出

流速：1 ml / 分

カラム温度：50℃

(イ) 逆相カラムを用いたHPLC分析

装置：L-6200型（日立製作所製）

カラム：L-カラム（4.6×250 mm）〔（財）化学薬品検査協会〕

溶離液：50 mM酢酸トリエチルアミン（pH 5.5）

検出：蛍光検出器 F-1150（日立製作所製）にて励起波長320 nm、
蛍光波長400 nmで検出

流速：1 ml / 分

カラム温度：40℃

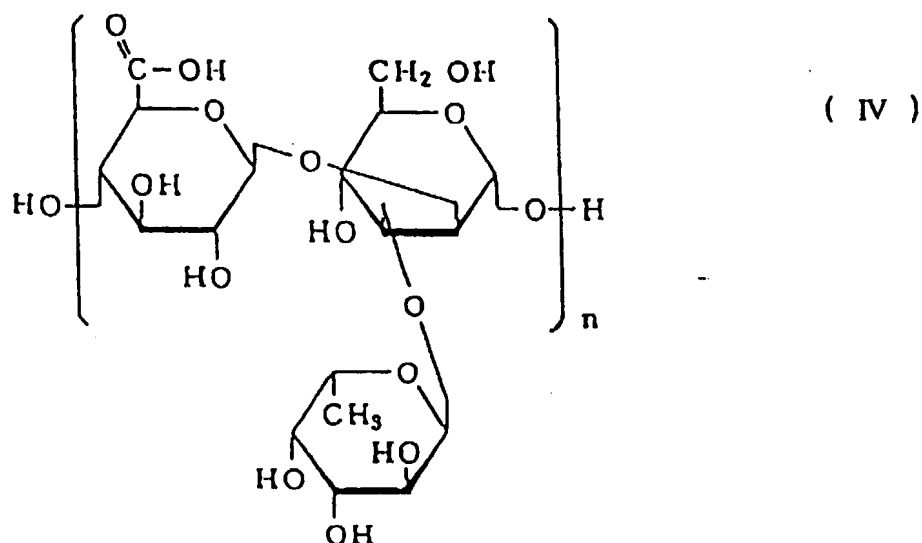
上記2種のHPLC分析の結果、フコイダン-Uを上記エンド型フコイダン分解酵素で分解して得られた3種のオリゴ糖と上記式（I）、（II）、及び（III）で表される3種のオリゴ糖は同一のものであった。

したがって（a）は、還元末端残基であるD-マンノースに不飽和D-グルクロン酸と、硫酸基が結合したL-フコースが結合した構造を持つ、（b）は硫酸基が結合した還元末端残基であるD-マンノースに不飽和D-グルクロン酸と、2個の硫酸基が結合したL-フコースが結合した構造を持つ、（c）は還元末端残基であるD-マンノースにD-グルクロン酸と、硫酸基が結合したL-フコースが結合し、そのD-グルクロン酸にD-マンノースが結合し、更にそのD-マンノースに不飽和D-グルクロン酸と、硫酸基が結合したL-フコースが結合した構造を持つ。

以上より、得られたフコイダン-Uは、D-グルクロン酸とD-マンノースが交互に結合した構造を持ち、少なくとも1つ以上のD-マンノースにL-フコー

スが結合している構造を有する。

また、下記一般式 (IV) で表される部分構造を有する (但し、式中の少なくとも1つのアルコール性水酸基は硫酸エステル化しており、また n は1以上の整数を表す)。



以上このフコイダン-Uに上記のエンド型フコイダン分解酵素を作用させると上記式 (I)、(II)、及び (III) で表されるオリゴ糖を生じた。

このフコイダン-Uの凍結乾燥物の比旋光度を高速・高感度旋光計 SEPA-300 (堀場製作所製) により測定したところ、 -53.6 度であった。

実施例 5

(1) フコイダン標準品、フコイダン-F、フコイダン-Uの調製

ガゴメ昆布を十分乾燥後、2 kg を自由粉碎機 (奈良機械製作所製) により粉碎し、得られた乾燥粉末を9リットルの80%エタノールに懸濁し80℃、2時間処理した。処理後ろ紙によりろ過し残渣を得た。この残渣に対して上記エタノール洗浄、ろ過という操作を3回繰り返しエタノール洗浄残渣を得た。この残渣

を36リットルの0.2M酢酸カルシウム溶液に懸濁後、95℃、2時間処理し、ろ過した。残渣を4リットルの0.2M酢酸カルシウム溶液で洗浄し、ガゴメ昆布のフコイダン抽出液36リットルを得た。得られたろ液に5%の塩化セチルピリジニウムをそれ以上沈殿が生じなくなるまで添加し遠心分離により沈殿を集めた。この沈殿を3リットルの0.4M食塩水に懸濁後遠心分離し、洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した後沈殿に1リットルの4M食塩水を添加しよくかくはん後エタノールを80%となるように添加し、かくはん後遠心分離により沈殿を得た。この沈殿を80%エタノール中に懸濁し遠心分離するという操作を、上清中の260nmの吸光度がなくなるまで繰り返した。この沈殿を2Mの食塩水3リットルに溶解し、不溶物を遠心分離により除去後、100mlのDEAE-セルロファインA-800（生化学工業社製）を添加し、かくはん後、加えた樹脂をろ過により除去した。ろ液を2Mの食塩水で平衡化したDEAE-セルロファインA-800カラムにかけ非吸着分を排除分子量10万以下のホロファイバーを備えた限外ろ過装置で限外ろ過し、着色性物質及び食塩を完全に除去後、遠心分離及びろ過により不溶性物質を除去し、凍結乾燥し、フコイダン標準物質を調製した。

該凍結乾燥フコイダン標準物質の重量は90gであった。

このフコイダン標準物質の凍結乾燥物を7g秤量し、0.2Mの塩化カルシウムに溶解した。次に、4000mlのDEAE-セファロースFFのカラムを0.2Mの塩化カルシウムで平衡化した。0.2Mの塩化カルシウムに溶解したフコイダン標準物質をDEAE-セファロースFFのカラムにかけ、0.2Mの塩化カルシウムで十分洗浄し、次に、0～4Mの塩化ナトリウムのグラジエントで溶出させた。溶出画分の内塩化ナトリウム濃度が0.05～0.8Mの画分を集め透析により脱塩後凍結乾燥し、実質的にフコイダン-Fと分離されたフコイダン-Uを2.1g得た。

また、上記溶出画分の内塩化ナトリウム濃度が0.9～1.5Mの画分を集め透析により脱塩後凍結乾燥し、実質的にフコイダン-Uと分離されたフコイダン

-Fを4.7g得た。

フコイダン-Fの分子量をセファクリルS-500を用いたゲルろ過法により求めたところ、約19万を中心とした分子量分布を示した。

フコイダン-Fの成分を実施例4に記載の方法に準じ分析した。

このフコイダン-Fの構成糖はフコース、ガラクトースで、そのモル比は約10:1であった。ウロン酸及びその他の中性糖は実質的に含有されていなかった。また、フコースと硫酸基のモル比は約1:2であった。

1%のフコイダン-F溶液16mlと、50mMのリン酸緩衝液(pH8.0)12mlと4Mの塩化ナトリウム4mlと32mU/mlの前記エンド型フコイダン分解酵素溶液8mlを混合し、25℃で48時間反応させた。反応による分解物の生成は認められず、フコイダン-Fの低分子化も認められなかった。

次に、このフコイダン-Fの凍結乾燥物の比旋光度を高速・高感度旋光計SEPA-300(堀場製作所製)により測定したところ、-135度であった。

(2) フコイダンとして上記実施例1-(3)記載のフコイダンVIの凍結乾燥物を使用し、フコイダン微生物分解物を下記のように調製した。

上記フコイダンVIの凍結乾燥物を60g秤量し、20リットルの人工海水(ジャマリンラボラトリー製)に溶解後ペプトン100gと酵母エキス2gを加え、30リットルのジャーファーマンターに入れ滅菌後、フラボバクテリウム s p. SA-0082株(FERM BP-5402)を植菌して培養温度24℃、pH7、かくはん125rpm、通気10リットル/分の条件下26時間培養した。培養液を遠心分離し菌体を除去後、排除分子量3万以下のホロファイバーを備えた限外ろ過装置で限外ろ過し、低分子性物質を完全に除去後、遠心分離及びろ過により不溶性物質を除去し、排除分子量3万以下のホロファイバーで排除されないフコイダン微生物分解物の凍結乾燥を行った。凍結乾燥フコイダン微生物分解物の重量は32gであった。

(3) 実施例1-(3)記載のフコイダンVIの凍結乾燥物を使用し、実施例5--(1)記載の方法に従いフコイダン-Uを調製し、フコイダン-Uのフコイ

ダン分解酵素分解物を下記のように調製した。

上記フコイダンV Iの凍結乾燥物を7 g秤量し、0.2 Mの塩化カルシウムに溶解した。次に、4000 mlのDEAE-セファロースFFのカラムを0.2 Mの塩化カルシウムで平衡化した。続いて、上記フコイダン溶解物をDEAE-セファロースFFのカラムにかけ、0.2 Mの塩化カルシウムで十分洗浄し、次に、0~4 Mの塩化ナトリウムのグラジエントで溶出させた。溶出画分の内塩化ナトリウム濃度が0.05~0.8 Mの画分を集め透析により脱塩後凍結乾燥し、フコイダン-Uを得た。

このように調製した5 gのフコイダン-Uと、100 mMのトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0) 250 mlと0.8 Mの塩化ナトリウム250 mlと19 U/mlのフラボバクテリウム sp. SA-0082株(FERM BP-5402)の生産するエンド型フコイダン分解酵素溶液0.15 mlを混合し、25℃で80時間反応させた。

反応液を分子量3000以下のホロファイバーを備えた限外ろ過装置で限外ろ過し、低分子性物質を完全に除去後、遠心分離及びろ過により不溶性物質を除去し、排除分子量3000以下のホロファイバーで排除されないフコイダン-U酵素分解物を集めた。この画分をマイクロアシライザーG3により脱塩後凍結乾燥し、フコイダン-Uの酵素分解物の凍結乾燥物2 gを得た。

(4) フコイダン-U、フコイダン-Fのアポトーシス誘発作用

56℃、30分間処理した牛胎児血清(JRHバイオサイエンス社)を10%含むRPMI 1640培地(ギブコ社製)にて37℃で培養したヒト前骨髄性白血病細胞HL-60(ATCC CCL-240)をASF104培地(味の素社製)にて 5×10^4 コ/900 μ lとなるように懸濁し、FALCON社製6ウェルプレート上の各ウェルに4.5 mlずつ分注した。それぞれの懸濁液に対し、実施例5-(1)で調製したフコイダン-F、及びフコイダン-Uを10 mg/mlとなるように120 mMの塩化ナトリウムを含む30 mMヘ pes 緩衝液(pH 7)に溶解し、121℃、20分間オートクレーブ処理したものを100 μ l添加し、37℃、5%二酸化炭素存在下で培養した。なお、対照として上記

緩衝液のみを同量添加し同様に培養した。培養開始16時間後と40時間後の生細胞数を「組織培養の技術」(第2版)(朝倉出版、日本組織培養学会編)記載の方法(第26~28頁)に従って計測した。すなわち、血球計算板上のトリパンブルー染色による方法で計測した。

得られた結果を図5に示す。すなわち図5はHL-60細胞の培養液にフコイダン-U又はフコイダン-Fを1mg/mlとなるように添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を表す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸は培養液中の生細胞数を示す。図5中の培地に添加したフコース硫酸含有多糖の種類は白丸印がフコイダン-U、黒丸印がフコイダン-Fであることを示す。なお対照(試料無添加)の培養液中の生細胞数は培養16時間後で 7×10^4 コ/ml、40時間後で 1.4×10^5 コ/mlであった。

この結果HL-60細胞はフコイダン-F、及びフコイダン-Uによりアポトーシスを誘発され細胞増殖速度が抑制されることが判明した。

上記実施例5-(2)、実施例5-(3)でそれぞれ調製したフコイダン微生物分解物、フコイダン-U酵素分解物をそれぞれ10mg/mlとなるように120mMの塩化ナトリウムを含む30mMヘペス緩衝液(pH7)に溶解し、121℃、20分間オートクレーブ処理したもののアポトーシス誘発作用を上記に準じ測定し、図5のフコイダン-Uと同様の結果を得た。

実施例6

緑茶葉10g、ビタミンC0.2g及びイオン交換水1000mlを用い、常法に従って緑茶を調製した。本発明品1は、実施例1のフコイダンIIを用い、製品100ml当りフコイダン30mgを添加した。本発明品2としては、実施例1のフコイダンIIと通常の高藻熱水抽出した物〔常法によって、ガゴメ昆布を用い、95℃、1時間熱水抽出し、抽出液を活性炭処理した後、更に凍結乾燥した(フコイダン比率50%)。以降の実施例で同様の物を用いた〕との混合物(フコイダン比率60%)を用い、製品100ml当りフコイダン30mgに相当する量を添加した。対照は、無添加のものとした。舌ざわり感、味のバランス、味

切れ、及びのどごし感についてパネラー20名で、5段階（5良、1悪）の官能評価を行い、その結果の平均値を表4に示した。

表4 官能評価

	本発明品 1	本発明品 2	対照
舌ざわり感			
まろやかさ	4. 5	3. 2	2. 1
なめらかさ	4. 7	2. 9	2. 0
味のバランス	4. 2	2. 7	2. 0
味切れ	4. 0	2. 5	2. 0
のどごし感	4. 5	3. 1	2. 3
食感の総合	4. 4	2. 9	2. 1

表4より、本発明品1及び2は対照に比べて、舌ざわり感がよくなり、味とのバランスと味切れがよくなり、茶の香味が引きたち、味のバランスが優れているとの評価であった。

実施例7

栄養ドリンクを表5に示す配合に従い、常法により調製した。

表 5 配合表

果糖ブドウ糖液糖	1 5 0	g
精製蜂蜜	2	g
ガラナエキス	1	g
高麗人参エキス	0. 1	g
ローヤルゼリー	0. 0 5	g
ビタミンC	0. 5	g
ニコチン酸アミド	0. 1	g
ビタミンB 1 塩酸塩	0. 0 2	g
ビタミンB 6 塩酸塩	0. 0 2	g
L-フェニルアラニン	0. 0 4	g
L-イソロイシン	0. 0 1	g
クエン酸	1. 5	g
香料	2	g
イオン交換水	残 余	
合計	1 0 0 0 m l	

本発明品 3 は、実施例 4 のフコイダン-U を用い、製品 1 0 0 m l 当りフコイダン 4 0 m g を添加した。本発明品 4 としては、実施例 4 のフコイダン-U と海藻熱水抽出物との混合物（フコイダン比率 6 7 %）を用い、製品 1 0 0 m l 当りフコイダン 4 0 m g に相当する量を添加した。対照は、フコイダン無添加のものを用意した。実施例 6 と同様にして官能評価を行った。その結果を表 6 に示した。

表 6 官能評価

	本発明品 3	本発明品 4	対照
舌ざわり感			
まろやかさ	3. 0	2. 5	1. 8
なめらかさ	3. 5	2. 4	1. 5
味のバランス	3. 6	3. 2	3. 0
味切れ	3. 8	3. 0	2. 8
のどごし感	3. 7	3. 4	3. 0
食感の総合	3. 4	2. 9	2. 4

表 6 より、本発明品 3 及び 4 は対照に比べて、舌ざわり感、味のバランス、味切れ、のどごし感が向上し、清涼感の富んだ飲料となった。

実施例 8

フコイダン濃厚タイプのドリンクを表 7 に示した配合で、常法に従い調製した。

表 7 配合表

麦芽糖液糖 (k g)	30.00
梅粉末 (k g)	0.50
1/5 レモン透明果汁 (k g)	2.00
ペクチン (k g)	3.00
無水クエン酸 (k g)	0.19
ビタミン C (k g)	0.20
香料 (k g)	1.20
脱イオン水	残量
計 (リットル)	1000

製品の pH 3.1

本発明品 5 は、実施例 1 - (2) 記載のフコイダン V を用い、製品 100 ml 当り、フコイダン 400 mg を添加した。本発明品 6 は、フコイダン V と海藻由来の熱水抽出物との混合物（フコイダン比率 80%）を用い、製品 100 ml 当りフコイダン 400 mg に当る量を添加した。対照としては、濃厚タイプのドリンクであるので、増粘剤であるジュランガム 400 mg / 100 ml を添加した対照 1 及びキサントガム 400 mg / 100 ml を添加した対照 2 を用意し、実施例 6 と同様にして官能検査を行い、表 8 にその結果を示した。

表 8 官能評価

	本発明品 5	本発明品 6	対照 1	対照 2
舌ざわり				
まろやかさ	4. 0	3. 7	3. 5	3. 4
なめらかさ	4. 1	3. 6	3. 3	3. 2
味のバランス	4. 0	3. 8	3. 2	3. 1
味切れ	3. 5	3. 3	3. 1	3. 3
のどごし感	3. 7	3. 6	3. 2	3. 3
食感総合	4. 0	3. 7	3. 3	3. 2

表 8 より、本発明品 5 及び本発明品 6 は対照 1、2 に比べて、舌ざわり感及び味のバランスが優れており、濃厚タイプのドリンクとして味なれした良好な製品に仕上がった。また実施例 1 - (3) 記載のフコイダン VI を用い、製品 100 ml 当たり、フコイダン 400 mg を添加し、濃厚タイプドリンクを作製し、同様の結果を得た。また実施例 5 - (2)、(3) でそれぞれ調製した分解物をそれぞれ用い、製品 100 ml 当たり、分解物 400 mg を添加し、濃厚タイプドリンクを作製し、同様の結果を得た。

実施例 9

アルコール含有飲料を表 9 に示す配合で、常法に従い調製した。

表 9 配合表

温州冷凍みかん濃縮果汁 (B r i x 度 4 5)	1 1 0	g
グラニュー糖	8 0	g
クエン酸	2	g
クエン酸ナトリウム	0. 5	g
オレンジエッセンス	2	g
5 V / V % アルコール水溶液	残 余	
合計	1 0 0 0	m l

注：配合の飲料を 5℃ に冷却後、ソーダーサイホンによって炭酸を含有させる。

本発明品 7 は、実施例 1 のフコイダン II を用い、製品 1 0 0 m l 当りフコイダン 3 5 m g を添加した。本発明品 8 としては、実施例 1 のフコイダン II と海藻熱水抽出物との混合物（フコイダン比率 5 5 %）を用い、フコイダン 3 5 m g に相当する量を添加した。対照は、フコイダン無添加のものを用いた。官能評価は、実施例 6 と同様に行い、その結果を表 1 0 に示した。

表 10 官能評価

	本発明品 7	本発明品 8	対照
舌ざわり感			
まろやかさ	4. 2	3. 3	2. 7
なめらかさ	4. 3	3. 1	2. 8
味のバランス	4. 0	3. 5	2. 5
味切れ	3. 9	3. 0	2. 7
のどごし感	3. 5	2. 7	2. 1
食感の総合	4. 0	3. 1	2. 6

表 10 に示すごとく、本発明品 7 及び 8 は対照と比較して、舌ざわり感、味のバランス、味切れ、のどごし感が改善されていることがわかった。特に、本発明品 7 は酸味がマイルドになり、完熟みかんのような風味に仕上がった。

実施例 10

スポーツ用ドリンクとして表 11 に示した配合で、常法に従い調製した。

表 1 1 配合表

ブドウ糖	4 8 g
果糖	7 . 8 g
クエン酸	1 . 4 g
クエン酸ナトリウム	1 . 0 g
精製塩	0 . 3 g
乳酸カルシウム	0 . 1 g
塩化マグネシウム	0 . 1 g
ビタミンC	0 . 2 g
ビタミンB 1 塩酸塩	0 . 0 2 g
レモンライム香料	2 g
イオン交換水	残 余
合計	1 0 0 0 g

本発明品 9 は、実施例 4 のフコイダン-U を用い、製品 1 0 0 g 当りフコイダン 3 0 m g を添加した。本発明品 1 0 としては、実施例 4 のフコイダン-U と海藻由来の熱水抽出物との混合物（フコイダン比率 7 5 %）を用い、フコイダン 3 0 m g に相当する量を添加した。対照には、フコイダン無添加のものを用意し、実施例 6 と同様にして官能評価し、表 1 2 にその結果を示した。

表 1 2 官能評価

	本発明品 9	本発明品 1 0	対照
舌ざわり感			
まろやかさ	4 . 5	3 . 8	2 . 5
なめらかさ	4 . 3	3 . 5	2 . 3
味のバランス	3 . 9	3 . 5	3 . 2
味切れ	3 . 7	3 . 2	2 . 9
のどごし感	4 . 0	3 . 5	2 . 8
食感の総合	4 . 0	3 . 5	2 . 7

表 1 2 より、本発明品 9 及び 1 0 は対照に比べて、舌ざわり感、のどごし感及び味のバランスが優れており、各成分間の調和が優れており、味なれの効果が顕著な製品に仕上がった。

実施例 1 1

実入り梅酒を作るため、5 リットルの蓋付き瓶容器に 7 5 w / w % 果糖ぶどう糖液糖 1 4 4 0 g、9 5 v / v % 原料用アルコール 6 7 0 m l、汲水 3 4 0 m l に混合した後、青梅 1 k g を入れる。

本発明品 1 1 は、仕込時に実施例 2 のフコイダン III を用い、製品 1 0 0 m l 当りフコイダン 4 0 m g を添加した。本発明品 1 2 としては、実施例 2 のフコイダン III と海藻熱水抽出物との混合物（フコイダン比率 7 0 %）を用い、製品 1 0 0 m l 当りフコイダン 4 0 m g に相当する量を添加した。対照は、フコイダン無添加とした。

それぞれの瓶に蓋をした後、室温で放置し、時折軽くかくはんし、2ヶ月間青梅を漬け込んだ。次に、28 v/v%アルコール水溶液1020 mlを追加して混合し、熟成を更に2ヶ月間続けて梅酒を得た。

熟成を終えたそれぞれの梅酒について実施例6と同様にして官能評価を行い、その結果を表13に示す。

表 1 3 官能評価

	本発明品 1 1	本発明品 1 2	対 照
舌ざわり感			
まろやかさ	4. 5	3. 2	2. 5
なめらかさ	4. 2	3. 3	2. 6
味のバランス	4. 6	4. 0	2. 4
味切れ	3. 8	3. 5	2. 7
のどごし感	4. 2	3. 4	2. 8
食感の総合	4. 3	3. 5	2. 6

表13より、本発明品11及び12は対照に比べて、舌ざわり感、のどごし感に優れ、長期熟成にみられるような味なれ及び味のバランスの効果がみられた。

実施例 1 2

普通牛乳の均質牛乳（水分88.6 w/v%、タンパク質2.8 w/v%、脂肪3.5 w/v%、乳糖4.5 w/v%、灰分0.8 w/v%）を用い、本発明品13は、実施例1のフコイダンIを用い、製品100 ml当りフコイダン30

mg を添加した。本発明品 1 4 としては、実施例 1 のフコイダン I と海藻熱水抽出物との混合物（フコイダン比率 8 0 %）を用い、フコイダン 3 0 mg に相当する量を添加した。対照は、無添加のものを用いた。官能評価は、実施例 6 と同様に行い、その結果を表 1 4 に示した。

表 1 4 官能評価

	本発明品 1 3	本発明品 1 4	対照
舌ざわり感			
まろやかさ	3 . 6	3 . 0	2 . 1
なめらかさ	3 . 5	2 . 9	2 . 5
味のバランス	4 . 0	3 . 6	3 . 0
味切れ	4 . 2	2 . 8	2 . 4
のどごし感	3 . 9	3 . 3	2 . 1
食感の総合	3 . 8	3 . 1	2 . 4

表 1 4 より、本発明品 1 3 及び 1 4 は対照に比べて、舌ざわり感、味のバランスが改善され、牛乳が舌にまとわりつくような食感、すなわち味切れの悪さに関して、味切れが良くなり、牛乳が飲みやすくなった。

実施例 1 3

常法に従い、大豆から豆乳を作り、凝固剤で凝固させ、通常のもめんごしの豆腐を調製した。

本発明品 1 5 は、豆乳中に実施例 2 のフコイダン IV を用い、製品 1 0 0 g 当り

フコイダン 40 mg を添加した。本発明品 16 としては、実施例 2 のフコイダン IV と海藻熱水抽出物との混合物（フコイダン比率 60%）を用い、製品 100 g 当り 40 mg のフコイダンに相当する量を添加した。対照は無添加のものを用い、官能評価は実施例 6 と同様に行い、その結果を表 15 に示した。

表 15 官能評価

	本発明品 15	本発明品 16	対照
舌ざわり感			
まろやかさ	4.0	3.2	2.8
なめらかさ	3.8	3.1	2.5
テクスチャー	3.6	3.2	2.8
食感の総合	3.8	3.2	2.7

表 15 より、本発明品 15 及び 16 は対照に比べて、舌ざわり感が改善され、もめんごし豆腐であるが、絹ごし豆腐のような舌ざわりの食感を生じ、総合した食感は著しく向上する。

実施例 14

菓子類として、チョコレートクリーム、キャンディ及びオレンジゼリーを試作した。

チョコレートクリームは、卵黄 2 個、牛乳 125 ml、小麦粉 10 g、砂糖 30 g を用い、加温しつつ練り上げて調製した。

キャンディは、砂糖 1.2 kg と水飴 0.8 kg をディゾルバー（110℃）

で溶解混合した後、クッカーで120～130℃まで煮上げ、水分含量2%以下とし、乳酸（50重量%溶液）16.3g、リンゴ酸10.1g、炭酸カルシウム5.0g、及び適量の香料を添加して調製した。

オレンジゼリーは、カラギーナン9gをグラニュー糖180gと混合し、水800mlを加え、混合、加熱溶解する。これに、温州みかん濃縮果汁10g、クエン酸2g、クエン酸ソーダ1.5g、オレンジアロマ2g、香料1gを加えて調製した。

本発明品17（チョコレートクリーム）、18（キャンディ）、19（オレンジゼリー）は、それぞれ実施例4のフコイダン-Uを用い、製品100g当りフコイダン20mgを添加した。本発明品20（チョコレートクリーム）、21（キャンディ）、22（オレンジゼリー）としては、実施例4のフコイダン-Uと海藻熱水抽出物との混合物（フコイダン比率60%）を用い、製品100g当りフコイダン20mgに相当する量を添加した。対照は、無添加のものをを用いた。官能評価は、実施例6と同様に行い、表16にその結果を示した。

表 1 6 官能評価

	舌ざわり感		テクスチャー		食感の総合	
	本発明品	対照	本発明品	対照	本発明品	対照
	17 20		17 20		17 20	
チョコ レート クリーム	3.5 2.9	2.4	3.7 3.2	2.6	3.6 3.0	2.5
	本発明品	対照	本発明品	対照	本発明品	対照
	18 21		18 21		18 21	
キャン ディ	3.8 3.1	2.3	3.6 3.2	2.4	3.7 3.1	2.3
	本発明品	対照	本発明品	対照	本発明品	対照
	19 22		19 22		19 22	
オレンジ ゼリー	4.2 3.0	2.2	4.1 2.9	2.3	4.1 2.9	2.2

表 1 6 より、本発明品 1 7、1 8、1 9 並びに 2 0、2 1、2 2 はそれぞれの

対照に比べて、舌ざわり感のなめらかさが向上し、マイルドな食感となり、総合的評価でも優れていた。

実施例 15

練り製品として、魚肉を用いたかまぼこ及び畜肉を用いたソーセージを試作した。

かまぼこは、スケトウすり身（SA級）1 kg に水 100 g、食塩 20 g を添加し、15 分間らいかいしたものを 40 g ずつビニールパックに詰め、5℃で一晩保存した後、常圧で 15 分間蒸して蒸しかまぼこを得る。

ソーセージは、豚肉 2 kg、豚脂肪 700 g を 5 mm 目で肉ひきし、コショウ 7 g、セージ 3 g、メース 1 g を混合し、カッティングした後、径 2 cm の豚腸を用いケーシングした。これを 15 分間蒸煮してソーセージを得る。

かまぼこにはらいかい前、及びソーセージにはカッティング前に、本発明品 23（かまぼこ）及び 24（ソーセージ）は、実施例 1 のフコイダン I を用い、製品 100 g 当りフコイダン 50 mg を添加した。本発明品 25（かまぼこ）及び 26（ソーセージ）としては、実施例 1 のフコイダン I と海藻熱水抽出物との混合物（フコイダン比率 67%）を用い、製品 100 g 当りフコイダン 50 mg に相当する量を添加した。対照は、無添加のものを用いた。官能評価は、実施例 6 と同様に行い、その結果を表 17 に示した。

表 1 7 官能評価

	舌ざわり感		テクスチャー		食感の総合	
	本発明品	対照	本発明品	対照	本発明品	対照
	23 25		23 25		23 25	
かまぼこ	3.8 3.4	2.7	3.7 3.0	2.6	3.7 3.2	2.6
	本発明品	対照	本発明品	対照	本発明品	対照
	24 26		24 26		24 26	
ソーセージ	3.8 3.1	2.8	3.6 3.1	2.5	3.7 3.1	2.6

表 1 7 より、本発明品 2 3、2 5（かまぼこ）及び本発明品 2 4、2 6（ソーセージ）の本発明品はそれぞれの対照に比べて、舌ざわり感の食感はマイルドになり、テクスチャーにも弾力性が向上した。

実施例 1 6

麺類として、ラーメンを試作した。すなわち、4 k g のラーメン専用粉（かんすい等を含む小麦粉）に乳酸ナトリウム 2 5 . 4 g（5 0 w / w % 溶液）、リンゴ酸ナトリウム 9 . 4 g、炭酸カルシウム 1 0 g を添加し、更に 1 . 6 リットルの水を添加し、そばろ状になるよう混合した。これを家庭用製麺機〔三洋電気（株）製〕で製麺した。

本発明品27は、実施例1のフコイダンIIを用い、製品100g当りフコイダン40mgを添加した。本発明品28としては、実施例1のフコイダンIIと海藻熱水抽出物との混合物（フコイダン比率60%）を用い、製品100g当りフコイダン40mgに相当する量を水を添加する前に添加混合した。対照は、無添加のものを用いた。

得られたそれぞれのラーメンを用い、通常の方法で調理した。官能評価は、実施例 6 と同様に行い、その結果を表 18 に示した。

表 1 8 官能評価

	本発明品 27	本発明品 28	対照
舌ざわり感	3. 8	3. 2	2. 5
テクスチャー	3. 5	3. 0	2. 8
食感の総合	3. 6	3. 1	2. 6

表 18 より、本発明品 27 及び 28 は対照に比べて、舌ざわり感が向上し、テクスチャーとしても弾力性があり、歯切れもよく、総合でも高い評価を受けた。

实施例 17

パン類として、食パン及び中華まんじゅうを常法に従って試作した。

食パン及び中華まんじゅうの皮の配合と調製条件を、それぞれ表19及び表20に示した。

表 1 9 パン配合割合及び調製条件

(中種配合)

小麦粉	7 0 重量部
イースト	2
イーストフード	0. 1
水	4 0

(本捏配合)

小麦粉	3 0 重量部
砂糖	5
食塩	2
ショートニング	5
カゼイン	0. 5
水	2 5

(調製条件)

発酵時間	4 時間 (温度 2 7 °C, 湿度 7 5 %)
焙炉時間	4 0 分 (温度 3 8 °C, 湿度 8 5 %)
焼成時間	3 5 分 (温度 2 1 0 °C)

表 2 0 中華まんじゅうの皮の配合割合及び調製条件

(配合割合)

小麦粉	1 0 0 重量部
砂糖	1 5
食塩	0 . 8
ベーキングパウダー	1
ラード	5
イースト	3 . 5
水	4 3 . 5

(調製条件)

焙炉時間	9 0 分 (温度 4 5 ℃, 湿度 7 5 %)
蒸し時間	1 5 分

これらの食パン及び中華まんじゅうの皮 1 0 0 g 当り、本発明品 2 9 (食パン) 及び 3 0 (中華まんじゅうの皮) は、実施例 2 のフコイダン IV を用い、フコイダン 3 5 m g を添加した。本発明品 3 1 (食パン) 及び 3 2 (中華まんじゅうの皮) としては、実施例 2 のフコイダン IV と海藻熱水抽出物との混合物 (フコイダン比率 8 0 %) を用い、フコイダン 3 5 m g に相当する量を原料配合時にそれぞれ添加した。それぞれの対照は、無添加のものを用いた。

得られた食パン及び中華まんじゅうの皮をサランラップに包み、5℃で 2 4 時間放置した。官能評価は、放置後の食パン及び中華まんじゅうの皮を用い、実施例 6 と同様に行い、その結果を表 2 1 に示した。

表 2 1 官能評価

	舌ざわり感		対照	テクスチャー		対照	食感の総合	
	本発明品			本発明品			本発明品	
	29	31		29	31		29	31
食パン	3.3	2.0	1.5	3.0	1.8	1.3	3.1	1.9
	30	32		30	32		30	32
中華まん じゅうの皮	2.8	2.1	1.6	3.4	1.7	1.1	3.1	1.9

パン類を低温で放置すると、しっとり感が劣化し、パサついた食感になるが、表 2 1 で示されるように、本発明品の 29、31 及び 30、32 はそれぞれの対照に比べて、放置後舌ざわり感やテクスチャーの食感が優れており、舌ざわり感やテクスチャーの食感における劣化防止がされており、食感の保持作用の効果が高いことがわかった。

実施例 18

常法により調製された清酒を用い、本発明品 33 は、実施例 4 のフコイダン U を用い、製品 100 ml 当りフコイダン 25 mg を添加した。本発明品 34 としては、実施例 4 のフコイダン U と海藻熱水抽出物との混合物（フコイダン比

率70%)を用い、製品100ml当りフコイダン25mgに相当する量を添加した。対照は、無添加のものを用いた。

官能評価は、実施例 6 と同様にして行った。評価項目に味、香りを追加し、その結果を表 22 に示した。

表 2 2 官能評価

	本発明品 3 3	本発明品 3 4	対 照
味	3 . 1	3 . 0	3 . 0
香り	2 . 9	2 . 8	2 . 9
舌ざわり感			
まろやかさ	3 . 9	3 . 2	2 . 5
なめらかさ	4 . 2	3 . 5	2 . 8
味のバランス	3 . 5	3 . 1	2 . 9
味切れ	3 . 6	3 . 2	2 . 7
のどごし感	3 . 8	3 . 0	2 . 6
総合	3 . 7	3 . 1	2 . 8

表 2 2 より、本発明品 3 3 及び 3 4 は対照に比べて、舌ざわり感、特になめらかさにおいて優れており、味切れ、のどごし感も向上し、嗜好品としての食感が改善する効果を見出した。

実施例 19

常法により調製されたみりん及び発酵調味料を用い、本発明品 35 (みりん) 及び 37 (発酵調味料) は、実施例 2 のフコイダン III を用い、製品 100 ml 当りフコイダン 30 mg を添加した。本発明品 36 (みりん) 及び 38 (発酵調味料) としては、実施例 2 のフコイダン III と海藻熱水抽出物との混合物 (フコイダン比率 67%) を用い、製品 100 ml 当りフコイダン 30 mg に相当する量を添加した。対照は、無添加のものを用いた。

官能評価は、実施例 6 と同様に行なった。評価項目に味、香りを追加し、その結果を表 23 に示した。

表 2 3 官能評価

	みりん		発酵調味料			
	本発明品		対照	本発明品		対照
	3 5	3 7		3 6	3 8	
味	2.9	2.8	2.8	2.7	2.6	2.7
香り	2.7	2.4	2.7	2.4	2.1	2.4
舌ざわり感						
まろやかさ	3.9	3.0	2.5	3.7	2.8	2.6
なめらかさ	4.1	3.2	2.7	3.8	2.9	2.4
味のバランス	3.4	3.2	3.1	2.9	2.5	2.4
味切れ	3.5	3.1	3.0	3.2	2.8	2.3
総合	3.4	3.0	2.8	3.1	2.6	2.5

表 2 3 より、本発明のみりん 3 5、3 7 及び発酵調味料 3 6、3 8 は、それぞれの対照に比べ、舌ざわり感、特になめらかさ、まろやかさ、味のバランスにおいて向上効果を示し、調味料として調理における食材の食感改善につながる。

実施例 2 0

ふりかけとして、魚粉4.7kg、海苔0.8kg、ごま2.5kg、食塩1.0kg、グルタミン酸ソーダ0.5kgを混合し、常法に従って造粒して調製した。

本発明品39は、実施例4のフコイダン-Uを用い、製品100g当りフコイダン1000mgを添加した。本発明品40としては、実施例4のフコイダン-U海藻熱水抽出物との混合物（フコイダン比率60%）を用い、製品100g当りフコイダン1000mgに相当する量を添加した。対照は、フコイダン無添加のものとした。これらふりかけを米飯にふりかけ、食感の官能評価を実施例6と同様に行なった。

その結果、本発明品39及び40は対照に比べて、口に含んだとき、米飯とよくなじみ、舌ざわり感がよく、ざらつき感がなく、総合してふりかけの品質を向上させることがわかった。

発明の効果

本発明の食品又は飲料は生理活性を有するフコイダン及び／又はその分解物を多量に含有し、該フコイダンの有するアポトーシス誘発作用等によって、これらを摂取することにより発癌予防、癌抑制効果等を有する健康食品又は飲料であり、特に胃腸健康保持に有用な機能性海洋繊維入りの食品又は飲料である。

本発明のフコイダン、特に海藻のフコイダンは食用の海藻植物、すなわち食用物質を原料として安価に大量に供給可能であり、且つ安全性が高い点においても優れている。また、本発明によりアルギン酸含量の低減又は除去されたフコイダンが提供され、該フコイダンは飲食品の本来の物性を損なわず、食感である舌ざわり感、味切れ、味なれ及びテクスチャー等を改善することができ、また食感面での良好な物性を保持する効果があるので、飲食品の製造において極めて有用である。

請 求 の 範 囲

1. フコイダン含有物由来のフコイダンを含有することを特徴とする食品又は飲料。
2. フコイダン含有物由来のアルギン類が低減又は除去されたフコイダンを含有することを特徴とする食品又は飲料。
3. フコイダンがフコイダン含有抽出物である請求の範囲第1項又は第2項記載の食品又は飲料。
4. フコイダン含有抽出物が、フコイダン含有物からの抽出をカルシウム塩存在下で行うことにより得られる物である請求の範囲第3項記載の食品又は飲料。
5. カルシウム塩が塩化カルシウムである請求の範囲第4項記載の食品又は飲料。
6. フコイダン含有抽出物が、フコイダン含有物からの抽出をアルカリ性溶液で行い、抽出液にカルシウム塩を添加した後得られる可溶性物である請求の範囲第3項記載の食品又は飲料。
7. アルカリ性溶液が炭酸ナトリウム溶液である請求の範囲第6項記載の食品又は飲料。
8. カルシウム塩が塩化カルシウムである請求の範囲第6項記載の食品又は飲料。
9. フコイダン含有抽出物が、フコイダン含有物からの抽出をアルカリ性溶液で行い、抽出液を酸性とした後得られる可溶性物である請求の範囲第3項記載の食品又は飲料。
10. アルカリ性溶液が炭酸ナトリウム溶液である請求の範囲第9項記載の食品又は飲料。
11. フコイダン含有物由来のアポトーシス誘発性を有するフコイダンを有効量含有することを特徴とするアポトーシス誘発性食品又は飲料。
12. フコイダン含有物由来のアルギン類が低減又は除去されたアポトーシス誘発性を有するフコイダンを有効量含有することを特徴とするアポトーシス誘発性

食品又は飲料。

13. フコイダンがフコイダン含有抽出物である請求の範囲第11項又は第12項記載のアポトーシス誘発性食品又は飲料。

14. フコイダン含有抽出物が、フコイダン含有物からの抽出をカルシウム塩存在下で行うことにより得られる物である請求の範囲第13項記載のアポトーシス誘発性食品又は飲料。

15. カルシウム塩が塩化カルシウムである請求の範囲第14項記載のアポトーシス誘発性食品又は飲料。

16. フコイダン含有抽出物が、フコイダン含有物からの抽出をアルカリ性溶液で行い、抽出液にカルシウム塩を添加した後得られる可溶性物である請求の範囲第13項記載のアポトーシス誘発性食品又は飲料。

17. アルカリ性溶液が炭酸ナトリウム溶液である請求の範囲第16項記載のアポトーシス誘発性食品又は飲料。

18. カルシウム塩が塩化カルシウムである請求の範囲第16項記載のアポトーシス誘発性食品又は飲料。

19. フコイダン含有抽出物が、フコイダン含有物からの抽出をアルカリ性溶液で行い、抽出液を酸性とした後得られる可溶性物である請求の範囲第13項記載のアポトーシス誘発性食品又は飲料。

20. アルカリ性溶液が炭酸ナトリウム溶液である請求の範囲第19項記載のアポトーシス誘発性食品又は飲料。

21. フコイダンが海藻のフコイダンである請求の範囲第1～20項のいずれか1項に記載の食品又は飲料。

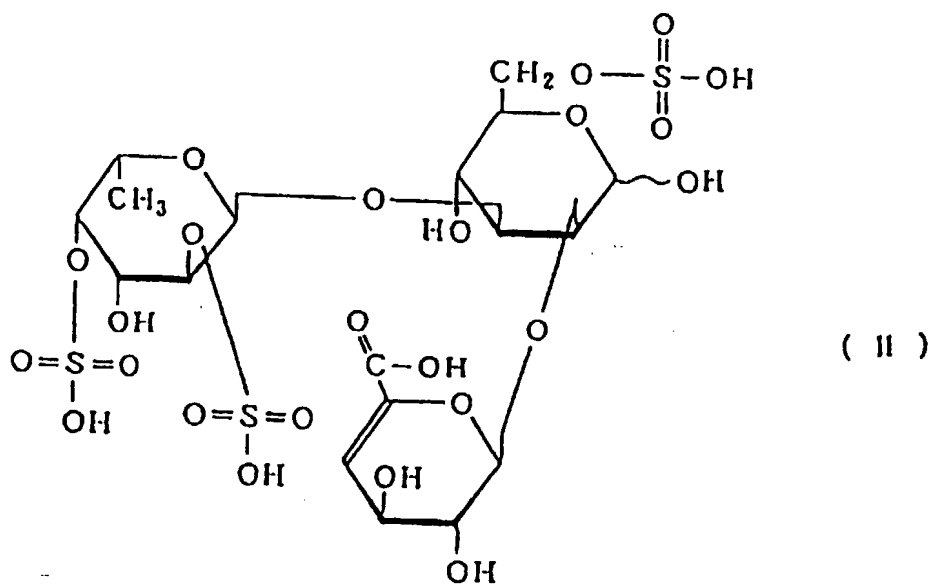
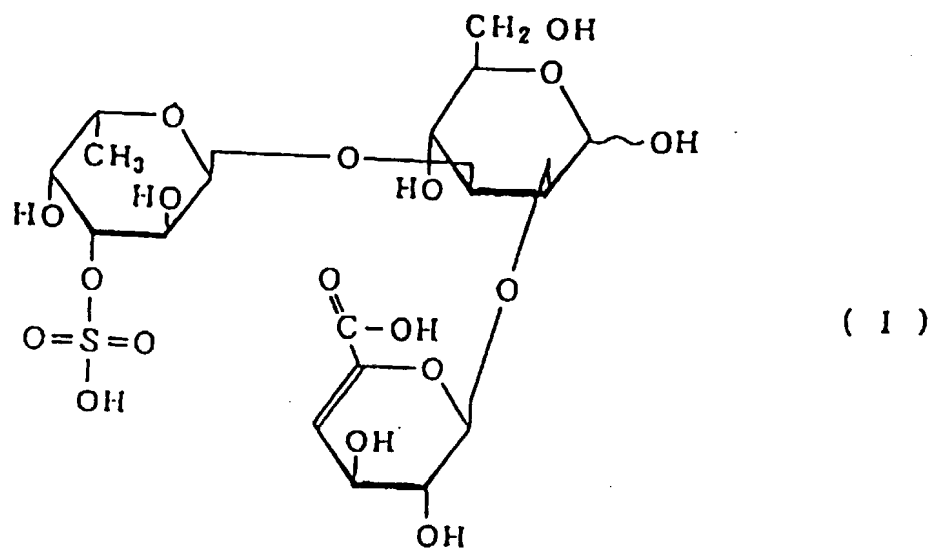
22. フコイダンが下記理化学的性質を有するフコイダン-U及び／又はフコイダン-Fである請求の範囲第1～21項のいずれか1項に記載の食品又は飲料。

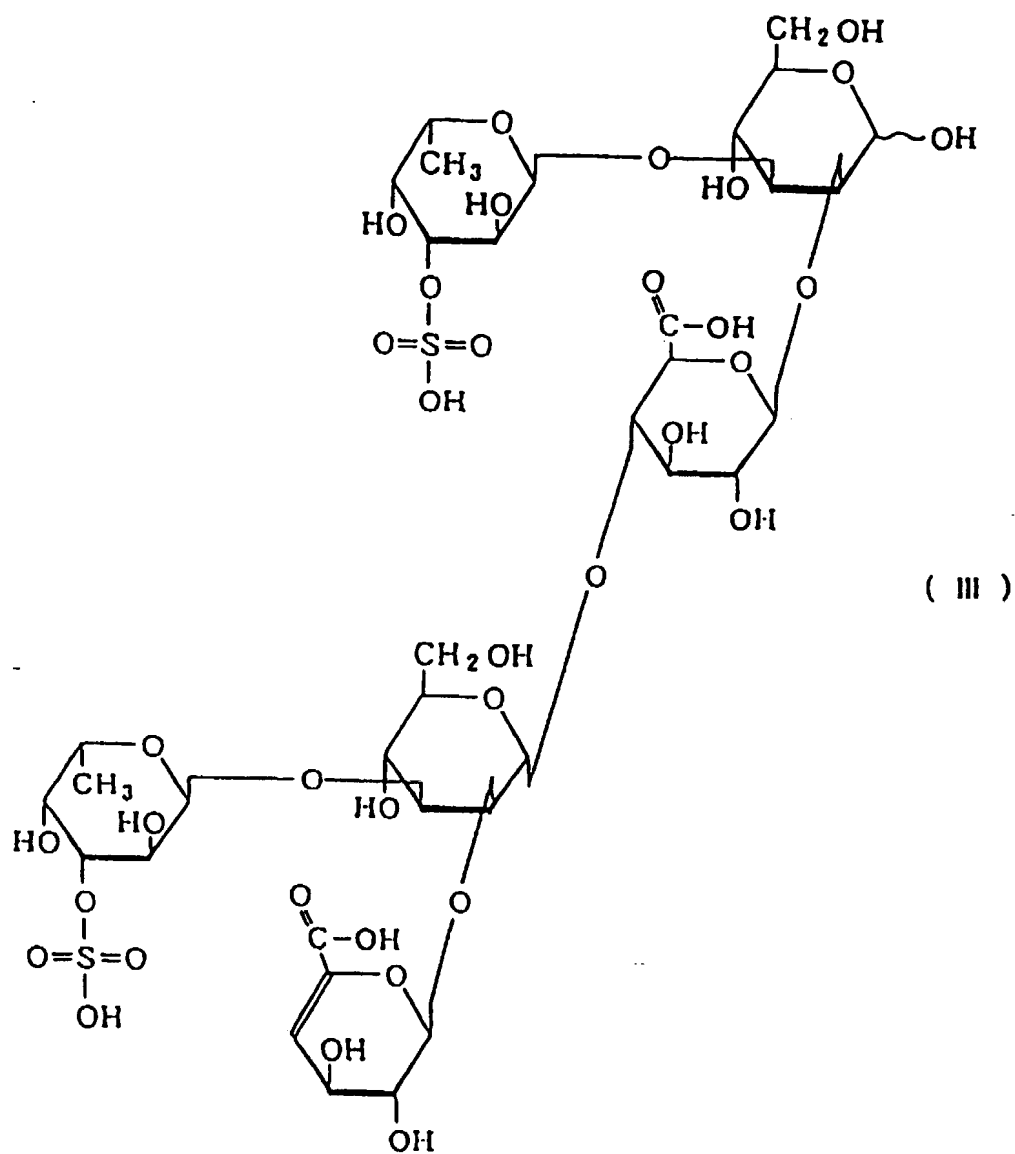
フコイダン-Uの理化学的性質、

(1) 構成糖：ウロン酸を含有する。

(2) フラボバクテリウム (Flavobacterium) sp. SA-0082 (FERM BP-5402) の生産するフコイダン分解酵素により低分子化し、少なくとも下記式(I)

、(Ⅱ)、(Ⅲ) で表される化合物より選択される一種以上の化合物が生成する。





フコイダン-Fの理化学的性質、

- (1) 構成糖：ウロン酸を実質的に含有しない。
- (2) フラボバクテリウム (Flavobacterium) sp. SA-0082 (FERM BP-5402) の生産するフコダイン分解酵素により実質上低分子化されない。
23. フコイダンがフコイダン分解物である請求の範囲第1項、第2項、第11項、第12項のいずれか1項に記載の食品又は飲料。
24. フコイダン含量がフコース換算重量として0.001w/w%以上であることを特徴とする請求の範囲第1～23項のいずれか1項に記載の食品又は飲料。

図 1

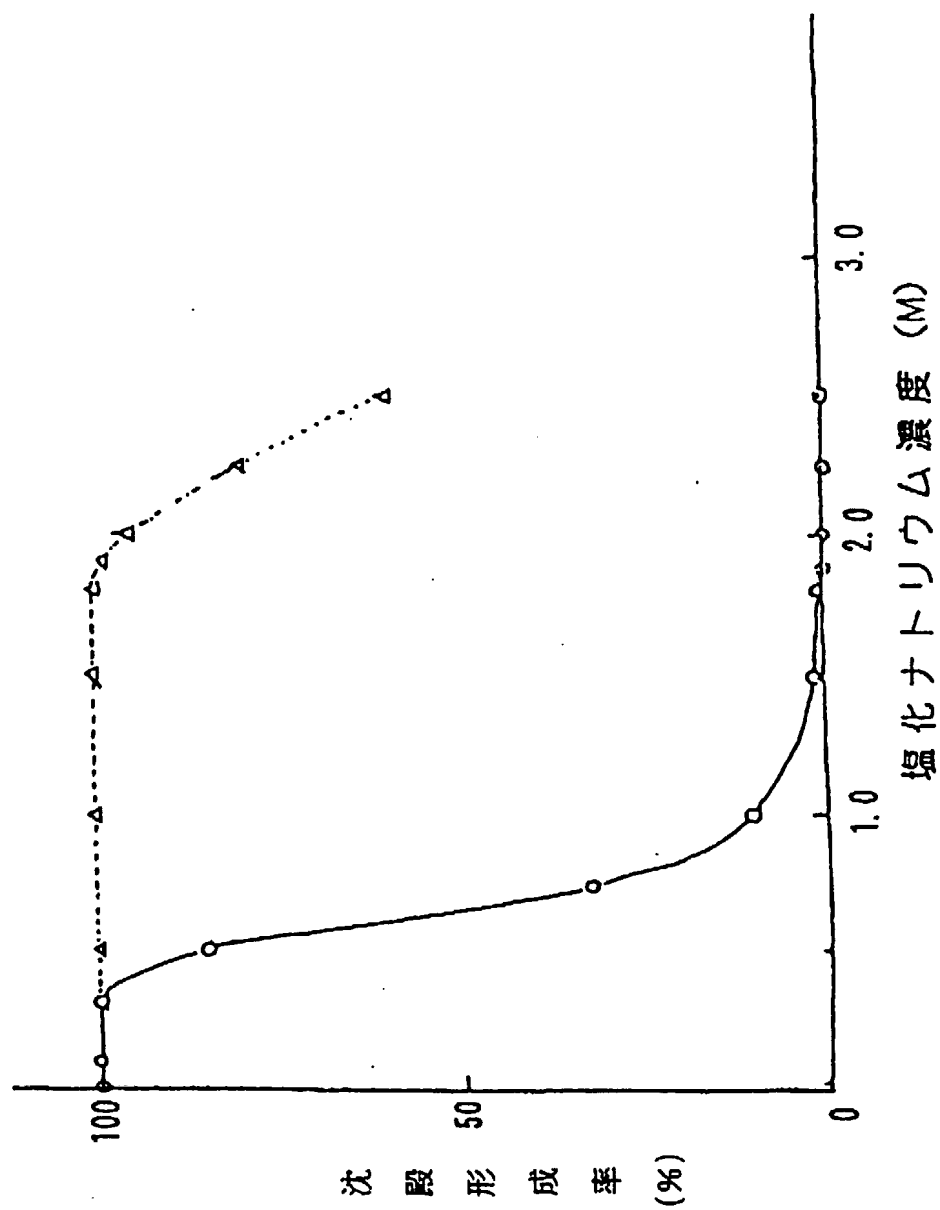


図 2

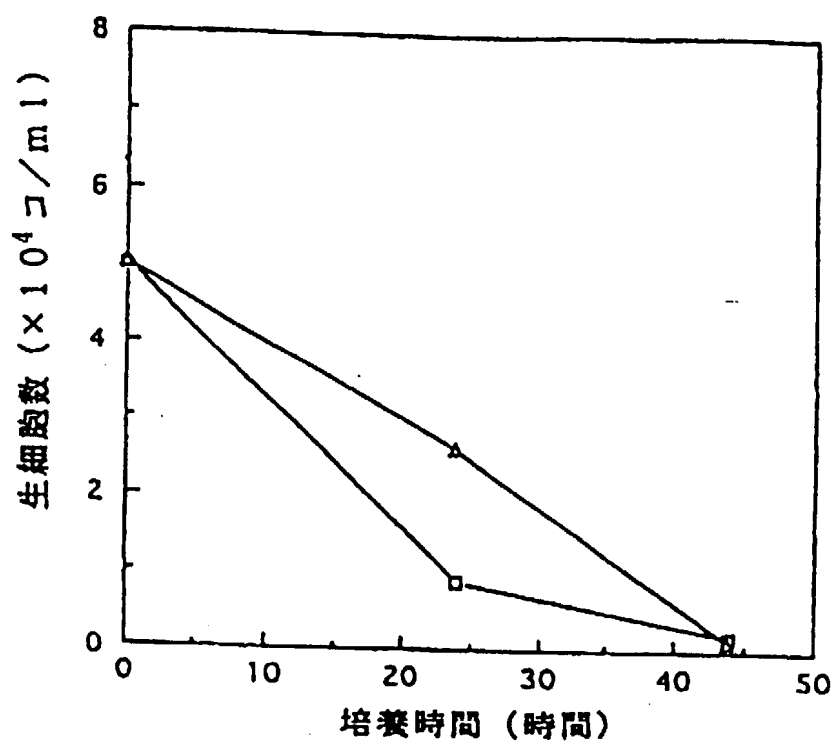


図 3

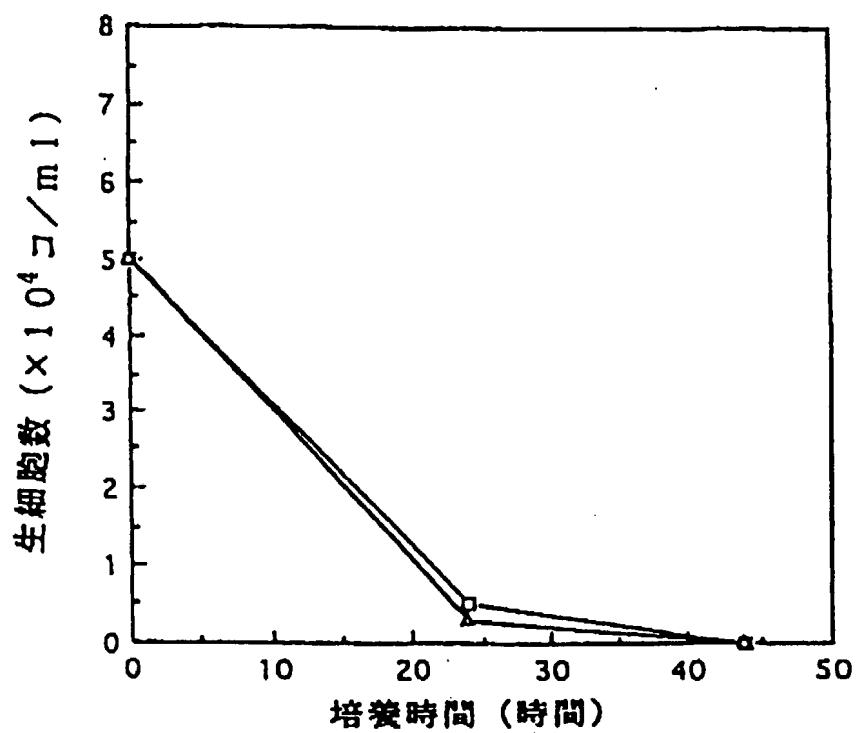


図 4

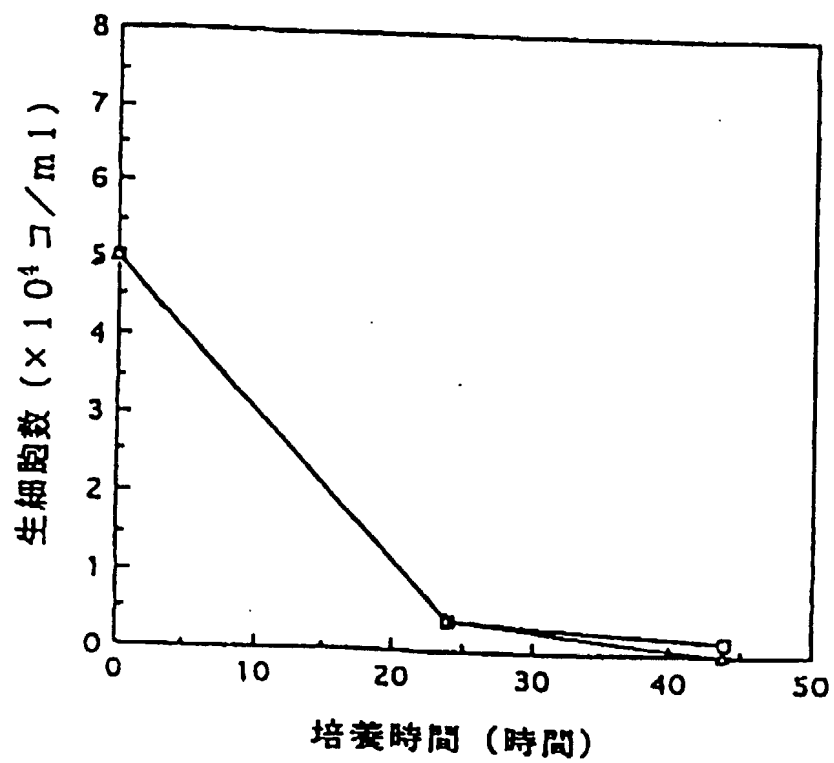
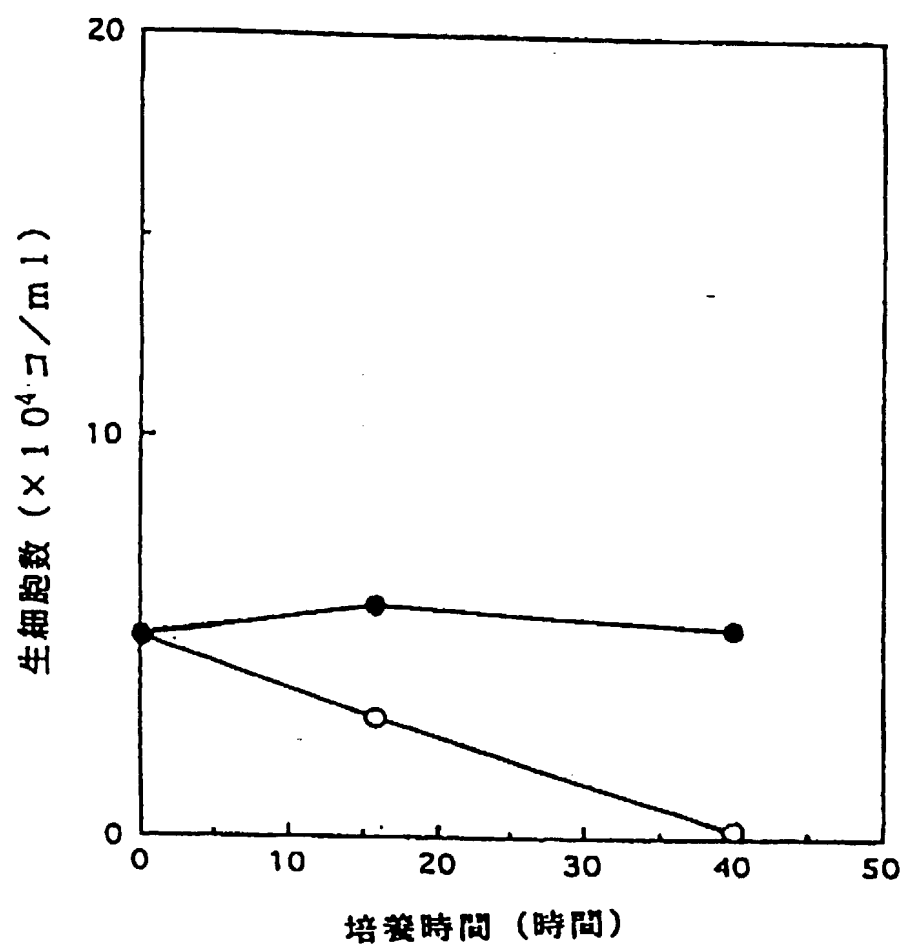


図 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01664

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A23L1/30, A61K35/80, C07H5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A23L1/30, A61K35/80, C07H5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

F-term, WPI/WPI,L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX/PA	JP, 9-40574, A (Biox Corp.), February 10, 1997 (10. 02. 97) (Family: none)	1/2-24
PX/PA	JP, 8-196234, A (Kakonotsuru Yugen Kaisha), August 6, 1996 (06. 08. 96) (Family: none)	1/2-24
A	JP, 1-87601, A (Yoshio Itaya), March 31, 1989 (31. 03. 89) (Family: none)	1 - 24
A	Agric. Biol. Chem. 44(8) 1980 T. Usui et al. "Isolation of Highly Purified Fucoidan from Eisenia bicyclis and Its Anticoagulant and Antitumor Activities" p. 1965-1966	1 - 24
A	JP, 7-215990, A (Takara Shuzo Co., Ltd.), August 15, 1995 (15. 08. 95) (Family: none)	1 - 24
A	JP, 7-138166, A (Yakult Honsha Co., Ltd.), May 30, 1995 (30. 05. 95) & EP, 645143, A	1 - 24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
August 8, 1997 (08. 08. 97)

Date of mailing of the international search report
August 19, 1997 (19. 08. 97)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01664

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 7-59564, A (K.K. Tohsa Kogaku Kenkyusho), March 7, 1995 (07. 03. 95) (Family: none)	1 - 24
A	JP, 2-502006, A (The Australian National University), July 5, 1990 (05. 07. 90) & EP, 631784, A & US, 5541166, A & WO, 8805301, A	1 - 24
A	JP, 1-313433, A (Japan Immuno Research Laboratories Co., Ltd.), December 18, 1989 (18. 12. 89) (Family: none)	1 - 24
A	JP, 1-100127, A (Suhichinku Rega Ve Zetto We), April 18, 1989 (18. 04. 89) & EP, 293826, A	1 - 24

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/01664

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o A23L1/30, A61K35/80, C07H5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o A23L1/30, A61K35/80, C07H5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

F-term, WPI/WPI, L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX/PA	JP, 9-40574, A (株式会社バイオックス) 10. 2月. 1997 (10. 02. 97) (Family: none)	1/2-24
PX/PA	JP, 8-196234, A (加好鶴有限会社) 6. 8月. 1996 (06. 08. 96) (Family: none)	1/2-24
A	JP, 1-87601, A (板谷喜郎) 31. 3月. 1989 (31. 03. 89) (Family: none)	1-24
A	Agric. Biol. Chem. 44(8) 1980 T. Usui et al. 「Isolation of Highly Purified Fucoidan from Eisenia bicyclis and Its Anticoagulant and Antitumor Activities」 p. 1965-1966	1-24
A	JP, 7-215990, A (寶酒造株式会社) 15. 8月. 1995 (15. 08. 95) (Family: none)	1-24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 08. 97

国際調査報告の発送日

19.08.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 美奈子

4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 7-138166, A(株式会社ヤクルト本社) 30. 5月. 1995(30. 05. 95)&EP, 645143, A	1-24
A	JP, 7-59564, A(株式会社糖鎖工学研究所) 7. 3月. 1995(07. 03. 95) (Family:none)	1-24
A	JP, 2-502006, A(ザオーストラリアンナショナルユニバーシティー) 5. 7月. 1990(05. 07. 90)& EP, 631784, A & US, 5541166, A & WO, 8805301, A	1-24
A	JP, 1-313433, A(株式会社日本抗体研究所) 18. 12月. 1989(18. 12. 89) (Family:none)	1-24
A	JP, 1-100127, A(スヒチンクレガヴェーゼットウェー) 18. 4月. 1989(18. 04. 89) & EP, 293826, A	1-24

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.